

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI
(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

008796962

WPI Acc No: 1991-300976/199141

XRAM Acc No: C91-130581

Human serum albumin fragment - where C-terminal of human serum albumin is lacking and which can be combined with various drugs

Patent Assignee: TONEN CORP (TOFU)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 3201987	A	19910903	JP 89344701	A	19891229	199141 B

Priority Applications (No Type Date): JP 89344701 A 19891229

Abstract (Basic): JP 3201987 A

A human serum albumin fragment in which C-terminal of human serum albumin is lacking, pref. having an amino acid sequence of the first aspartic acid to the 303rd proline in human serum albumin, a fused protein consisting of the above fragment and another polypeptide; a human serum albumin fragment in which N-terminal of human serum albumin is lacking, a fused protein consisting of the above fragment and another polypeptide, a DNA sequence coding the above fragment or the above fused protein, a plasmid contg. the above DNA sequence, a host transformed by the above plasmid and the prepn. of the fused protein.

USE/ADVANTAGE - The fragment can be combined to various drugs at the central region. (23pp Dwg.No.0/10)

Title Terms: HUMAN; SERUM; ALBUMIN; FRAGMENT; TERMINAL; HUMAN; SERUM; ALBUMIN; LACK; CAN; COMBINATION; VARIOUS; DRUG

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Additional): C07K-013/00; C07K-015/16;

C12N-001/19; C12N-015/14; C12P-021/02

File Segment: CPI

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平3-201987

⑬ Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成3年(1991)9月3日

C 12 N 15/14
C 07 K 13/008619-4H
8717-4B

C 12 N 15/00

A※

審査請求 未請求 請求項の数 13 (全23頁)

⑮ 発明の名称 ヒト血清アルブミン断片

⑯ 特 願 平1-344701

⑰ 出 願 平1(1989)12月29日

⑱ 発 明 者 柳 田 光 昭 埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡1丁目3番1号 東燃株式会社総合研究所内

⑲ 発 明 者 横 昇 埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡1丁目3番1号 東燃株式会社総合研究所内

⑳ 発 明 者 鈴木 正 則 埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡1丁目3番1号 東燃株式会社総合研究所内

㉑ 出 願 人 東 燃 株 式 会 社 東京都千代田区一ツ橋1丁目1番1号

㉒ 代 理 人 弁理士 青 木 朗 外4名

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

ヒト血清アルブミン断片

2. 特許請求の範囲

1. ヒト血清アルブミンのC末端部分が欠失したヒト血清アルブミン断片。

2. ヒト血清アルブミンの1位のアスパラギン酸から303位のプロリンまでのアミノ酸配列を有する請求項1に記載の断片。

3. ヒト血清アルブミンのC末端部分の欠失したヒト血清アルブミン断片と他のポリペプチドとから成る融合蛋白質。

4. ヒト血清アルブミンのシグナルペプチド及びプロペプチドと、ヒト血清アルブミンの1位のアスパラギン酸から303位のプロリンまでのアミノ酸配列とから成る請求項3に記載の融合蛋白質。

5. ヒト血清アルブミンのN-末端部分が欠失したヒト血清アルブミン断片。

6. ヒト血清アルブミンの123位のメチオニンから585位のロイシンまでのアミノ酸配列を有する

請求項5に記載のヒト血清アルブミン断片。

7. ヒト血清アルブミンのN-末端部分が欠失したヒト血清アルブミン断片と他のポリペプチドとから成る融合蛋白質。

8. ヒト血清アルブミンのシグナルペプチド及びプロペプチドとヒト血清アルブミンの123位のメチオニンから585位のロイシンまでのアミノ酸配列とから成る請求項7に記載の融合蛋白質。

9. 請求項1, 5に記載の蛋白質断片又は請求項3, 7に記載の融合蛋白質をコードするDNA配列。

10. 請求項9に記載のDNA配列を含有するプラスミド。

11. 前記DNA配列の上流に、該DNA配列を宿主内で効率よく発現せしめるための制御配列を含有する発現プラスミドである、請求項10に記載のプラスミド。

12. 請求項11に記載のプラスミドにより形質転換された宿主。

13. 請求項12に記載の宿主を培養してヒト血清

アルブミン蛋白質断片又は該断片を含む融合蛋白質を発現せしめ、融合蛋白質を発現せしめた場合には所望により該融合蛋白質から該ヒト血清アルブミン蛋白質断片を切り出すことを特徴とする、ヒト血清アルブミン蛋白質断片又は該断片を含有する融合蛋白質の製造方法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明はヒト血清アルブミンの部分から成る蛋白質断片に関する。この蛋白質断片は薬物等の運搬・供給系のキャリアー等としての用途が期待される。

(従来の技術)

ヒト血清アルブミンはヒト肝臓で合成される分子量66,458の高分子血漿蛋白質で、生体内では主に血液の浸透圧調節、種々の物質(例えば脂肪酸、 Cu^{2+} ・ Ni^{2+} などの金属イオン、胆汁ビリルビン、多くの薬物、一部の水溶性ビタミン、など)と結合してそれらの標的臓器への運搬、組織へのアミ

ノ酸供給源、などの重要な役割を果たしている。これらの作用を基礎にして火傷や腎炎などによるアルブミンの喪失や肝硬変などによるアルブミン合成の低下で起こる低アルブミン血症や出血性ショックなどの治療にヒト血清アルブミンは大量に使用されている。血清アルブミンはまた、多くの薬物と非特異的に結合し、それらの血中運搬の役割を果たしている。アルブミンと結合した薬物は血液循環によって体内を動き、やがてアルブミンと遊離して毛細血管壁を通過して拡散し、作用部位へと到達すると考えられている。アルブミンは毒性が少ない、抗原性が低い、生体内で簡単に分解される、薬物との共有結合及び複合体形成が簡単にできる、等のドラッグデリバリーのための担体(ドラッグキャリアー)として優れた特徴を有しており、また各種薬剤の結合サイトも決定または推定されているものが多く、製剤化のためのデザインが簡単にできるという利点も有している。

基本的にはヒト血清アルブミンの断片でも推定されている多くの薬剤に対する結合部位はほとん

ど含んでおり、ドラッグキャリアーとしての活性を示すことができると考えられる。薬物等の運搬・供給系におけるキャリアー等として使用する場合には、薬物等との結合性を限定する等の見地から、むしろヒト血清アルブミン分子全体を使用するよりもその断片を使用する方が有利であると予想される。

一般に、蛋白質を切断してその断片を調製する方法として、蛋白質を臭化シアンのごとき化学物質又はトリブシン、ペプシン等のプロテアーゼを用いる方法が知られている。しかしながら、これらの方法においては、蛋白質のアミノ酸配列に依存して切断部位が必然的に定まるため、任意の部位で切断することができず、従って理想的な蛋白質断片を得ることはできない。従って、ヒト血清アルブミンについてもその様な断片は得られていない。

(発明が解決しようとする課題)

これに対して、組換えDNA技術を用いれば、

任意の部分からなるヒト血清アルブミン断片を適当な宿主細胞中で合成させることができる。従って本発明は、ヒト血清アルブミンの所望の蛋白質断片をコードするDNAを作製し、これに基づく組換えDNA技術により、ヒト血清アルブミンの蛋白質断片及びその製造手段を提供しようとするものである。

さらに詳しくは、本発明は、ヒト血清アルブミンのC-末端部分が欠失したヒト血清アルブミン断片、及び該断片と他のポリペプチドとから成る融合蛋白質、並びにヒト血清アルブミンのN-末端部分が欠失したヒト血清アルブミン断片、及び該断片と他のポリペプチドとから成る融合蛋白質；これらの蛋白質断片又は融合蛋白質をコードするDNA；該DNAを含有するプラスミド；該プラスミドにより形質転換された宿主；及び前記宿主を培養してヒト血清アルブミン蛋白質断片又は該断片を含む融合蛋白質を発現せしめ、融合蛋白質を発現せしめた場合には所望により該融合蛋白質から該ヒト血清アルブミン断片を宿主細胞内又は

試験管内で切り出すことを特徴とするヒト血清アルブミン蛋白質断片又は該断片を含有する融合蛋白質の製造方法に関する。

〔具体的な説明〕

正常ヒト血清アルブミンAをコードするcDNAはすでにクローン化されている（特願昭63-037453）。従って、このcDNAを用いて、遺伝子工学的手法により正常ヒト血清アルブミンAの任意の断片を製造することができる。

本発明は、この様な断片として、（1）ヒト血清アルブミンのC-末端を欠失した血清アルブミン断片、及び（2）ヒト血清アルブミンのN-末端を欠失した血清アルブミン断片を提供する。本発明は例えば、C-末端が欠失したアルブミン断片の例として正常ヒト血清アルブミンの1位のアスパラギン酸から303位のプロリンまでのアミノ酸配列を有するアルブミン断片（これをミニHSAと称する場合がある）について記載し、そしてN-末端が欠失したアルブミン断片の例として正

常ヒト血清アルブミンの123位のメチオニンから585位のロイシンまでのアミノ酸配列から成るアルブミン断片（これを短縮HSAと称する場合がある）について記載する。

これら本発明の2つのタイプのアルブミン断片はそれぞれ下記のごとき特徴を有している。

本発明のアルブミン断片は、いずれもヒト血清アルブミンの中央部分を含有している。この様に、中央部分を含めたのは、ヒト血清アルブミン分子上の薬剤結合位置は現在までに4つ（サイトI～IV）知られており（Sjöholm, I., Ekman, B. E., Kober, A., Ljungstedt-Pahlman, I., Selving, B. & Sjödin, T. *Mol. Pharmacol.* **16**, 767- (1979)）、これらのサイトにおいて薬物の結合に重要な役割を果たすアミノ酸残基もいくつか知られている（Fehske, K. *Biochem. Pharmacol.* **30**, 688- (1981)）が、そのほとんどがこの中央部分に集中しているためである。

Sjöholmらは薬物をヒト血清アルブミンに均一に分散させた小球体を使い、多種の薬物の結合位置を調べ、ジアゼパムサイト（サイトI）、ジギ

トキシンサイト（サイトII）、及びワルファリンサイト（サイトIII）に分類しているが、この他にタモキシフェン（サイトIV）またはビリルビン結合サイトが存在するらしい。Fehskeらはジアゼパムサイト、ワルファリンサイト、ビリルビン結合サイトにおいて重要な役割をしているアミノ酸として各々Lys195とHis146及びArg145, Trp214及びLys199, Lys240を推定している。一方バルミチン酸塩のような長鎖脂肪酸の結合サイトはC端側領域にあるらしく（Reed, R. G., Feldhoff, R. C., Clute, O. L. & Peters, T. Jr. *Biochemistry*, **14**, 4578- (1975); Berde, C. B., Hudson, B. S., Simoni, R. D. & Sklar, L. A. J. *Biol. Chem.* **254**, 391- (1979)）、本発明のC-末端を欠失したヒト血清アルブミン断片を利用すれば長鎖脂肪酸が結合できず、ジアゼパム、ワルファリン等が結合できるドラッグキャリアーの作製が可能となる。

ヒト血清アルブミンは585個のアミノ酸から成る高分子蛋白質で、しかも分子内に35個のシステイン残基を有し、そのうち最もN端側に位置する

システイン残基(Cys-34)のみが遊離のSH基を有する状態で存在し、その他のものは互いにジスルフィド(S-S)結合を形成し、計17個のS-S橋が分子内に形成されている。蛋白質分子の高次（立体）構造形成の過程で少なくとも2種の酵素〔ペプチジルプロリル cis-trans イソメラーゼ及びプロテインジスルフィドイソメラーゼ(PDI)〕が関与していることが最近明らかになってきたが、S-S橋形成に重要な役割を果たすのは後者のPDIである。血清アルブミンを産生する哺乳類の細胞内では生合成及び血清アルブミン蛋白質の細胞内輸送の過程でPDIが働き蛋白質分子内にS-S橋が形成され、PDIの主な存在場所は小胞体を含むミクロソーム画分であることが知られている。大腸菌をはじめとする原核生物細胞内でヒト血清アルブミンを生合成させた場合には上述のような反応が起き、分子内に正しいS-S橋が形成される保証はなく、Cys-34が分子内のシステイン残基とチオール/ジスルフィド交換反応を起こし、S-S橋のかけ違えが生じ、異性

体を生じる可能性がある。このように遊離のSH基を有するシステイン残基が存在すると本来あるべき正常な立体構造をとった蛋白質ができる効率が低くなり、異常な立体構造をとった蛋白質は機能的にも正常でなくなる危険性が大となる。これに対して、本発明のN-末端部分が欠失した、123位のメチオニンから585位のロイシンまでのアミノ酸配列から成るアルブミン断片では、Cys34が他の6個のアミノ末端側に位置するシステインと共に除かれており、このような危険性を少なくしてある。

本発明においては、前記2つのタイプのアルブミン断片の代表例として特定のアミノ配列範囲を有する2種類のアルブミン断片を具体的に記載するが、2つのタイプのアルブミン断片はそれぞれ前記のごとき特徴を有しており、それらの特徴を発揮することができるアルブミン断片はすべて本発明の範囲に属する。例えば、薬剤結合部位が集中している中央部分として第123位のメチオニンから303位のプロリンまでの範囲を例示したが、

中央部分は必ずしもこの範囲に限定されず、薬剤結合部位の大部分を含む範囲であれば、第123位～303位よりも長くても、短かくてもよい。また、長鎖脂肪酸の結合部位が存在し、従って除去されるべきC-末端側領域として304位からC-末端までの範囲を例示したが、これに限らず、長鎖脂肪酸の結合部位を含む範囲であれば、さらに長い範囲でもよく、又短い範囲でもよい。さらに、システインを多数含有し、従って除去されるべきN-末端の範囲としてN-末端から122位までの範囲を例示したが、第34位のシステインを含有するN-末端側領域であればN-末端から122位までの範囲に限定されるものではなく、さらに長い又は短い範囲であってもよい。

従って、次の条件を考慮しながら種々のアルブミン断片をデザインすることができ、それらは本発明の範囲に属する。ヒト血清アルブミンの断片をデザインするために重要な条件として、特定の薬物結合に必要な立体構造を保持することが期待できるような断片を選定することが重要である。

この際注意すべきことは(i)天然のヒト血清アルブミンの構造中に存在するS-S橋をそのままの形で保持させること、(ii)そのため断片を構成するポリペプチド鎖中には偶数個のシステイン残基を有すること、(iii)S-S橋で結ばれてループを形成しているポリペプチド鎖の途中に切断を入れないこと、即ち天然ヒト血清アルブミン分子中にいくつか存在する主要なドメイン構造あるいは少なくともサブドメイン構造は破壊しないこと、などがあげられる。

1. 遺伝子系 宿主

正常ヒト血清アルブミンは分子内に多くのジスルフィド結合を含有しており、組換えDNA法によって天然物と同じ立体構造を有する正常ヒト血清アルブミン又は断片を製造するには、これらのジスルフィド結合が生産宿主細胞中で正しく形成されることが必須である。正常な立体構造の形成にはプロテインジスルフィドイソメラーゼ、ペプチジルプロリル cis-trans イソメラーゼ等の酵

素が関与していることが最近明らかになり、多数のS-S結合を有し複雑な立体構造をとる蛋白質を殆ど含まない大腸菌や枯草菌のような原核生物細胞ではたとえあってもこのような立体構造形成(フォールディング)関連酵素系の働きは強くないことが予想される。一方、ヒトをはじめとする真核高等生物の細胞は数多くの複雑な高次構造を有する蛋白質(糖蛋白質や他の修飾蛋白質も含む)を細胞外に分泌することが知られているが、下等真核微生物である酵母菌でも、哺乳動物の細胞で蛋白質が分泌されるのと非常によく似た経路により蛋白質が分泌されることが知られている(Huf-faker, T.C. and Robbins, P.W. J. Biol. Chem. 257, 3203-3210 (1982); Snider, M.D. in Ginsburg, V. & Robbins, P.W. (eds.) *Biology of Carbohydrates*, Vol. 2, Wiley, New York, (1984), pp. 163-198)。このため異種生物由来(特に哺乳動物)の遺伝子(主としてcDNA)を酵母菌内で発現させ遺伝子産物である蛋白質を、細胞外に分泌せしめようとする実験が最近多く試みられてきた。たとえばヒト

インターフェロン α 、 α 、 γ (Hitzeman, R.A., Leung, D.W., Perry, L.J., Kohr, W.J., Levine, H.L., Goeddel, D.V. Science **219**, 620-625(1983))、
 仔ウシプロキモシン (Smith, R.A., Duncan, M.J., Moir, D.T. Science **229**, 1219-1224(1985))、
 ヒト上皮成長因子 (Brake, A.J., Merryweather, J.P., Coit, D.G., Heberlein, U.A., Masiarz, F.R., Mullenbach, G.T., Urdea, M.S., Valenzuela, P., Barr, P.J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **81**, 4642-4646(1984))、
 マウスインターロイキン2 (Miyajima, A., Bond, M. W., Otsu, K., Arai, K., Arai, N. Gene **37**, 155-161 (1985))、
 ヒト β -エンドルフィン (Bitter, G. A., Chen, K.K., Banks, A.R., Lai, P.-H. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **81**, 5530-5534(1984)) など酵母菌による細胞外分泌が報告されているが、その分泌効率はマウスインターロイキン2の約80%からヒトインターフェロンの4~10%まで目的とする蛋白質によりかなりの差がある。又、これらのうちその蛋白質自身のシグナルペプチドを用いて細胞内輸送を試み、そのシグナルペプチドがうまく

ある。

4. 外来性の遺伝物質を細胞内及びゲノム内に取り込ませることが容易である。

5. 蛋白質の細胞内輸送及び、細胞外分泌の遺伝学及び生理学に対する理解が急速に高まっている。

6. 適切なプラスミドベクターを選択すれば、外来性の遺伝子をエピソード状態 (YEP系プラスミド使用)、ゲノムに組み込ませた状態 (YIPプラスミド使用)、酵母のセントロメアを含む細胞分裂に伴い染色体DNAとともに複製できる状態 (YCPプラスミド使用)、及び酵母の自律複製配列 (ARS) を含む自律的に複製できる状態 (YRPプラスミド使用) の4種の状態におくことができる。

7. シグナルペプチドやプロ配列などの細胞内プロセッシング機能がある。

8. 酵母菌で合成される糖蛋白質に見い出される糖鎖は高等動植物の糖蛋白質における複合型糖鎖とは異なる高マンノース型糖鎖ではあるが、酵

く切断されて分泌することに成功しているのはヒトインターフェロンである。その他のものは酵母インベルターゼ (SUC2) のシグナルペプチドや接合因子 α 1 (MF α 1) のリーダー配列など酵母の蛋白質の細胞内輸送に必要なシグナル配列を目的とする成熟蛋白質に直接融合した形で発現させ、細胞内輸送を行わせたものである。さらに正しい位置でプロセッシングを受けていることが明らかなのは少なく、ヒトインターフェロンの場合は約半分が正しいプロセッシングを受けているが、ヒト β -エンドルフィンではペプチド内部でも切断を受けている。

酵母菌を宿主として用いる遺伝子工学的物質生産性の特徴としては以下のようなものがある。

1. 大量高密度培養による発酵生産が容易かつ経済的である。また動植物の培養細胞系と比較して厳密に管理制御された培養装置を特別必要としない。
2. 発酵生産に多くの経験が蓄積されている。
3. 分子遺伝学的な知識が急速に蓄積されつつ

母菌の小胞体で起こるコア糖鎖の付加は高等動物と共通した過程であり、両者における相違は外側の糖鎖の付加に見られるのみである。

9. ビタミン、微量因子等の添加により完全合成培地で形質転換体を生育させることができる。

10. 純粋なグルコースでなく粗製の糖源を利用してしても形質転換体を生育させることができる。

このような背景に基づいて、本発明においては酵母を宿主として使用する。

(ブレプロ配列)

ヒト血清アルブミン断片を酵母細胞中で発現せしめ、これを効率よく分泌せしめるためには、N-末端にブレプロ配列が存在する必要がある。また、このブレプロ配列は目的蛋白質の分泌の際に切除されて該目的蛋白質が成熟型で分泌される必要がある。このため本発明においては、この様な条件を満たすブレプロ配列としてヒト血清アルブミンの本来のブレプロ配列を使用する。

酵母における蛋白質の発現を増強するためには該蛋白質のN-末端領域をコードするコドンとし

て、酵母中で効率よく翻訳されるコドンを使用するのが好ましい。このため、本発明においては、前記ブレプロ配列をコードするDNA配列として、酵母において効率よく発現される遺伝子において高頻度で使用されるコドンから構成される合成DNA配列を使用する。この様なコドンとして例えば次のコドンを用いる。

Lys=AAG Trp=TCG Val=GTT Thr=ACT
Phe=TTT Ile=ATC Ser=TCT Leu=TTG
Ala=GCT Tyr=TAC Arg=AGA Gly=GGT

ブレプロ配列をコードするDNA部分の一例として次の配列を用いることができる。

AA TTC ATG AAG TGG GTT ACT TTC ATC TCT TTG
G TAC TTC ACC CAA TGA AAG TAG AGA AAC
Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu

EcoR I

TTG TTC TTG TTC TCT TCT GCT TAC TCT AGA
AAC AAG AAC AAG AGA AGA CGA ATG AGA TCT
Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala Tyr Ser Arg

GGT GTT TTC AGA CG
CCA CAA AAG TCT GCG C
Gly Val Phe Arg Arg

上記の配列のN-末端のMetのコドンの上流にはEcoR I 粘着末端が設けられており、この制限

酵素部位により上記配列はベクターに挿入される。また、上記ブレプロ配列のC-末端のArgのコドンとしては、酵母での翻訳のために好ましいとして上記したコドンではなく、CGCが採用されており、これにより5'-末端をCla Iにより切断したヒト血清アルブミン断片と連結することができる。

ヒト血清アルブミン断片遺伝子

ヒト血清アルブミンAをコードする遺伝子(cDNA)

はすでにクローン化されており、その塩基配列及び該塩基配列から推定されるアミノ酸配列は、特願昭63-037453に詳細に記載されている。従って本発明においては、このcDNAを含有するプラスミドpUC・HSA・CH等をヒト血清アルブミン断片をコードする遺伝子の供給源として使用することができる。なお、これらのプラスミドの作製方法を参考例として後記する。

ポリA配列及びAATAAAシグナル

コード配列の3'-末端の下流に存在するポリA配列及びAATAAAシグナルが真核生物のmRNAの安

定性に寄与すると言われている(Bergmann及びBrownerman Biochemistry, 16,259-264(1977); Huezら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 78,908-911(1981))。従って、本発明の好ましい態様においては、ヒト血清アルブミンAをコードするcDNAの下流にこれらの配列を配置する。ポリA配列及びAATAAAシグナルとしては、例えばヒト血清アルブミンA cDNAに自然に付随しているこれらの配列を使用することができる。これらの配列を含有するヒト血清アルブミンA遺伝子はすでにクローン化されており、特願昭63-037453に記載されている。これらの配列の供給源として例えばλgt11(HSA-1A)を使用することができ、その作製方法を参考例において後記する。

プロモーター

本発明においては、酵母細胞中で機能するものであればいずれのプロモーターを使用することもできる。しかしながら本発明においては誘導可能なプロモーターではなく構成的プロモーターを使用するのが好ましい。誘導可能なプロモーターを

使用して誘導操作を行った場合にはヒト血清アルブミンが細胞内に急激に蓄積し、分子間ジスルフィド結合が形成されて非天然型の立体構造を有する分子が生成する可能性があるからである。

弱い誘発性を示すか又は構成性の酵母プロモーターの内、強力な活性を持つものとしては、例えば、アルコールデヒドロゲナーゼ(ADH I) プロモーター、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAP) プロモーター、及びグリセリン酸リン酸キナーゼ(PGK) プロモーターがあり、本発明においては、ADH Iプロモーターを例にとって具体的に説明する。

酵母ADH I遺伝子(ADC1)を含む約2,100塩基対の領域の塩基配列が既に決定されており、ADH Iをコードする約1,100塩基対の配列の他に750塩基対の5'側非翻訳配列と320塩基対の3'側非翻訳配列が判明している(Bennetzen, J および Hall, B. J. Biol. Chem. 257, 3018-3025(1982))。転写においてRNAポリメラーゼによる認識配列と考えられているGoldberg-Hognessボックス(TATA

ボックス)は翻訳開始コドンATGの128塩基上流(-128の位置)にあり、ADH I プロモーター活性は-410の位置にあるSph I 認識部位より上流を欠失させても失われまいといわれている[Beier及びYoung, Nature 300, 724-728(1982)]。ADH I プロモーターによる転写物は通常の酵母菌で全ポリ(A) RNAの少なくとも1%に達する[Ammerer, G. Methods Enzymol. 101, 192-201(1983)]。

ターミネーター

転写における読み越し(read-through)により遺伝子生成物の量が減少する例が報告されている[例えば、Zaref, K.S. 及びSherman, F., Cell 28, 563-573, (1982)]。この現象を防止するためには発現されるべき構造遺伝子の下流にターミネーターを設けるのが好ましい。酵母ターミネーターを外来遺伝子の下流に配置し、遺伝子の発現を上昇させた例としてはたとえばPGKプロモーター/ターミネーターからなるサンドイッチベクターを用いて子牛キモシンを発現させた実験があり、

ターミネーターの導入により数倍〜十倍程度の発現上昇が報告されている[Mellorら Gene 24, 1-14(1983)]。このような目的のためのターミネーターとしてはさまざまな遺伝子由来のものが使用でき、たとえばTRP5(トリプトファン合成酵素)遺伝子やCYC1(イソ-1-チトクロームC)遺伝子などのターミネーターが利用されている。強力なプロモーターが関与する転写の場合、リードスルーを防ぐために強力なターミネーターがその下流に配置されている方が発現の制御に好都合と考えられる。このため本発明においては例えば強力なプロモーターを有する遺伝子のターミネーターであるADH Iターミネーター、GAPターミネーター等を用いるのが好ましい。

ベクター要素

以上、本発明の発現プラスミド中に含有される、発現に直接関連する要素について説明したが、本発明の発現プラスミドは、さらに、酵母複製起点及び標識遺伝子を含有しなければならない。酵母複製起点としては、例えば酵母由来の2 μ プラス

ミドDNAの複製起点等を使用することができる。標識遺伝子としては、宿主に薬剤耐性を付与する遺伝子、宿主の栄養要求性を補完する遺伝子等、常用の標識遺伝子を用いることができる。さらに、プラスミドの組換え操作の際にプラスミドの複製を大腸菌中で行わせる必要があるため、本発明のプラスミドは大腸菌複製起点及び標識遺伝子を含有するシャトルベクターであることが好ましい。この様な、シャトルベクターとしての基本的要件を備えたベクターとして市販のプラスミドpJDB207等を用いることができる。このプラスミドpJDB207中の酵母標識遺伝子は、ロイシン生成酵素である β -イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素をコードするLEU2遺伝子である。

発現プラスミド

従って本発明の好ましい発現プラスミドにおいては、酵母複製起点及び標識遺伝子並びに大腸菌複製起点及び標識遺伝子を含んでなるシャトルベクターに、プロモーター、アレプロ配列をコードするリーダー配列が連結されたヒト血清アルブミ

ン断片をコードする遺伝子、ポリA配列及びターミネーターがこの順序で挿入されている。

2. 形質転換

本発明のプラスミドによる宿主酵母の形質転換は常法に従って行うことができ、その具体例を実施例9に記載する。

3. 酵母の培養及びヒト血清アルブミン断片の回収

ヒト血清アルブミン断片cDNAを含んだ発現プラスミドにより形質転換された宿主酵母菌は通常の酵母の培養法により培養できる。たとえばYPDのような天然完全培地やSD培地に1%の酵母エキスを加えたような不完全合成培地でも培養できる。

培養後細胞外に分泌されたヒト血清アルブミン断片の回収は種々の方法で可能である。エタノール、アセトン、硫酸アンモニウムなどによる分別沈澱、等電点沈澱、限外ろ過などによる濃縮及び部分精製を行った後に各種クロマトグラフィーや上記部分精製法を組み合わせれば高度に分泌ヒト

血清アルブミン断片が精製されることが期待できる。

正常ヒト血清アルブミンAの全体又は大部分をコードするcDNAの作製方法は参考例1において具体的に記載する。目的とする蛋白質断片をコードするDNAは、その全体を常法に従って化学合成することもでき、又前記のcDNAから調製することもできる。cDNAから調製する場合、正常ヒト血清アルブミンAの全体又は大部分をコードするcDNAを、目的とする蛋白質断片をコードするcDNA領域の5'末端又は3'末端の内側で、適切な制限エンドスクレアーゼにより切断し、不足の末端コード配列を化学合成したDNAにより補完することにより調製される。あるいは、cDNAを、目的とする蛋白質断片をコードするcDNA領域の5'末端又は3'末端外側で、適切な制限エンドスクレアーゼにより切断した後、余分のDNA部分をエキソスクレアーゼにより除去することもできる。上記2つの方法の内5'末端と3'末端の加工において異なる方法を組み合わせることもできる。

願分に記載)から短縮型ヒト血清アルブミン(Met 123 ~ Leu585)をコードする部分を各々得て、これらを適当な方法で連結すれば完成する。

本発明の正常ヒト血清アルブミン断片をコードするDNAは、それ自体として発現させることもできるが、他のペプチドをコードするDNAと連結した状態で発現せしめ、融合蛋白質を得ることができる。この様な融合蛋白質を得る場合の融合パートナーとして種々のペプチドを用いることができ、その1つとして例えばヒト血清アルブミンのリーダー配列が挙げられる。目的とするヒト血清アルブミン断片をこの様な融合蛋白質として得る場合には、その後、細胞内または試験管内でリーダー配列を除去してヒト血清アルブミン断片を得ることができる。

ヒト血清アルブミン断片の発現のためには、例えば前記のごとき融合蛋白質をコードするDNAを適当な発現ベクター、例えばプラスミドに挿入した後、該ベクターを宿主に導入する。発現用宿主としては動物細胞や酵母のごとき真核細胞、及

本発明の例においては、ヒト血清アルブミンのシグナルペプチド及びプロペプチドとミニHSAの融合蛋白質をコードするDNAとしては既に特願昭63-268302に記載のヒト血清アルブミンのシグナルペプチド及びプロペプチドと全長の成熟ヒト血清アルブミン分子との融合蛋白質をコードするDNAを含むプラスミドpUC-HSA-ERからヒト血清アルブミンのシグナルペプチド及びプロペプチド及びヒト血清アルブミンAのAsp1~Pro152までをコードするDNAを特願昭63-268302に記載のプラスミドpUC-HSA-Iから切り出したGlu153~Pro303をコードするDNA断片とを融合したものを使用する。短縮HSAをコードするDNAとしてはヒト血清アルブミンのカルボキシル末端側をコードする部分を欠くcDNAクローンHSA-II(S632/22出願分に記載)からヒト血清アルブミンのプレプロ配列を、大腸菌アルカリホスファターゼのシグナルペプチド及び短縮型ヒト血清アルブミンの融合蛋白質をコードするDNA配列を含むpAT-trp-phoA-HSA(H1.8/25出

び細菌のごとき原核細胞を用いることができ、ベクターは宿主に依存して選択される。

〔発明の効果〕

本発明のC-末端領域を欠失したアルブミン断片は、C-末端に存在する長鎖脂肪酸の結合部位を欠いているため、長鎖脂肪酸を結合せず、しかも中央領域により種々の薬物と結合することができるという特徴を有する。他方、N-末端領域を欠失したアルブミン断片はCys34及び他の多数のシステイン残基を欠いており、蛋白質の安定なフォールディングのために有利である。

次に、本発明のヒト血清アルブミン断片の製造について、実施例により具体的に説明する。

なお、実施例中に特に記載しない場合、DNAの処理のための酵素反応は次の条件によった。

実験方法

酵素反応

各酵素反応は次の条件で行った。制限酵素EcoRI(ニッポンジーン;20ユニット/μl)、HindIII

(宝酒造; 10ユニット/ μ l)、BamHI (宝酒造; 12ユニット/ μ l)、XhoI (宝酒造; 12ユニット/ μ l) によるDNAの消化: DNA 2 μ g、酵素1 μ l 及び10×EcoRI緩衝液 (1M Tris-HCl (pH7.5)、100mM MgCl₂、500mM NaCl) 2 μ lに滅菌蒸留水を加えて20 μ lとする。37℃で1時間反応させて切断する。BstEII (ニッポンジーン; 7.5ユニット/ μ l)、PstI (ニッポンジーン; 20ユニット/ μ l) の場合は10×EcoRI緩衝液の代わりに100mM Tris-HCl (pH8.0)、70mM MgCl₂、1.5M NaClを使用し、BstEIIは60℃で、PstIは37℃でそれぞれ1時間保温して反応させる。SmaI (ニッポンジーン; 10ユニット/ μ l) の場合は10×EcoRI緩衝液の代わりに100mM Tris-HCl (pH8.0)、70mM MgCl₂、200mM KCl 4 μ lを使用し、37℃でそれぞれ1時間保温して反応させる。T4リガーゼ処理は次の条件で行った。ベクターDNA 1 μ g、ベクターDNAと等モル量のDNAフラグメント、10×リガーゼ緩衝液 (660mM Tris-HCl (pH7.5)、66mM MgCl₂、100mM ジチオスライトール、1mM

ATP) 2 μ l及びT4 DNAリガーゼ1 μ l (宝酒造; 約400ユニット/ μ l) に滅菌蒸留水を加えて20 μ lとし、16℃で一晩保温する。

実施例1. 酵母菌でのミニHSA発現プラスミドの構築

ミニHSA発現プラスミドの構築は次のように行った。まず pUC-HSA-EH (参考例3) から EcoRI-HpaII で切り出した天然型HSAブレプロ配列とAspI-Pro152をコードするフラグメント、及び pUC-HSA-I (参考例5) から HpaII-PstI により切り出したGlu153-Pro303をコードするフラグメントを、プラスミドpUC19のEcoRI-PstI部位に挿入してプラスミド pUC-mHSA-EHを作製した。この pUC-mHSA-EHをブレプロHSA cDNA配列の5'端にあるEcoRI部位で切断し、ここに両末端がEcoRI粘着末端配列で内部にXhoI部位をもつ合成リンカーを挿入してプラスミド pUC-mHSAを作製した。この pUC-mHSAから XhoI-HindIII で切り出したフラグメント、及び pUC-nHSAからHindIII-BamHIで切り出したブレプロ

HSA cDNAの3'側配列でポリAシグナル及びポリA配列を含む領域を、プラスミドpUC18XのXhoI-BamHI部位に挿入してプラスミド pUC-mHSA-Aを作製した。なお、ここで用いたプラスミド pUC18Xは、pUC18のEcoRI部位に上記と同様に両末端がEcoRI粘着末端配列で内部にXhoI部位をもつ合成リンカーを挿入して作製したものである。また pUC-nHSAは天然のブレプロHSA cDNA配列を含むプラスミド pAT-nHSA-A (参考例8) を XhoI/BamHIで二重消化して、ブレプロHSA cDNA部分を含む断片を得て、これをpUC18XをXhoI/BamHIで二重消化して得た大きな断片と連結して作製したプラスミドである。次に、プラスミド pUC-mHSA-AのブレプロミニHSA翻訳領域、ポリAシグナル、ポリA配列を含むXhoI-BamHIフラグメントを、pJDB-ADH-nHSA-Aプラスミド (このプラスミドを含有する大腸菌*Escherichia coli* HB101/pJDB-ADH-nHSA-Aは工業技術院微生物工業技術研究所に微工研菌寄第2454号(FERM BP-2454)として1989年6月8日に特許第2454号

約に基き国際寄託されている。) から XhoI-BamHIにより切り出した大きい方のフラグメントと連結し、pJDB-ADH-mHSAプラスミドを作製した。

実施例2. 酵母菌での短縮HSA発現プラスミドの構築

短縮HSA発現プラスミドの構築は以下のように行った。まず、ヒト血清アルブミンのカルボキシル末端側をコードする部分を欠くcDNAクローン HSA- Δ IIをEcoRIで切り、生じたフラグメントをpUC19のEcoRIサイトに挿入しプラスミド pUC-HSA- Δ IIを得た。プラスミド pUC-HSA- Δ IIからEcoRI-TaqIによりHSAの5'側非翻訳領域、及び天然型HSAブレプロ配列を含むフラグメントを切り出し、プラスミドpUC18のEcoRI-AccI部位に挿入してプラスミド pUC-Sigを作製した。このプラスミド pUC-SigからHincIIによりHSAの5'側非翻訳領域、及び天然型HSAブレプロ配列を含むフラグメントを切り出し、プラスミドpSALII (参考例5)のSmaI部位

に挿入してプラスミド pUC-Sig - SAL II を作製した。これにより得られたプラスミド pUC-Sig - SAL II は H S A の 5' 側非翻訳領域、天然型 H S A プレプロ配列及び Met123~Pro 303 をコードするが、プレプロ配列と Met123 の間にアミノ酸で Gly-Ser に対応するコドン GGATCC がアダプター配列として残っている。次に pUC-Sig - SAL II から BstE II - Pst I により切り出したプレプロ配列と Gly-Ser 及び Met123~Pro303 をコードするフラグメントを、前述の pUC-nHSA から BstE II - Pst I により切断して得られる大きい方のフラグメントに連結し、プラスミド pUC-nSAL II を作製した。このプラスミド pUC-nSAL II から BamH I - Hind III により切り出した大きい方のフラグメントに、pAT-trp-phoA-tHSA (このプラスミドを含有する大腸菌 HB101 (pAT-trp-phoA-tHSA) は工業技術院微生物工業技術研究所に微工研菌寄第 10951 号 (PEMP P-1051) として寄託されている。) から BamH I - Hind III により切り出した短縮 H S A をコードするフラグメントを挿入し、プ

スミド pUC-nHSA を作製した。このプラスミド pUC-nHSA から Xho I - Hind III により切り出したプレプロ配列と tHSA をコードするフラグメント、及び pUC-nHSA から Hind III - BamH I により切り出したポリ A シグナルを含むフラグメントをプラスミド pUC18X の Xho I - BamH I 部位に挿入し、プラスミド pUC-nHSA - A を作製した。このプラスミド pUC-nHSA - A から Xho I - Sma I により切り出したフラグメントを pJDB-ADH - nHSA - A プラスミドから Xho I - Sma I により切り出した大きい方のフラグメントと連結し、酵母菌での発現プラスミド pJDB-ADH - tHSA を作製した。

実施例 3. 酵母菌の形質転換

H S A 断片発現プラスミド pJDB-ADH - nHSA 及び pJDB-ADH - tHSA による酵母菌の形質転換は、橋本英明、木村光の K U R 法 (発酵と工業、43, 630-637 (1985)) を改変した方法により行った。まず、Y P D 培地 (1% 酵母エキス (Difco)、2% バクトペプトン (Difco)、2% グルコース) 50 ml に AH22 株 (MATa, leu2-3, leu2-112, his4

-519, can1) の Y P D 培地による一晚培養液 1 ml を加え、30℃ で 600nm での吸光度が 0.5 に達するまで培養した。これを 4℃ で 2000rpm、5 分間の遠心で集菌し、菌体を 5 ml の 0.1 M-LiSCN に懸濁した。次にそのうちの 1.5 ml を分取して 2000 rpm、5 分間の遠心で集菌し、菌体を 10 ml の 2 M-LiSCN、46 ml の 50% ポリエチレングリコール 4000 に懸濁し、さらに 10 ml の DNA 溶液 (5-10 µg の DNA を含む) を加えて 30℃ で一晚保温した。この懸濁液に 500 µl の滅菌蒸留水を加えてボルテックスミキサーにてよく振とうした後、2000rpm、5 分間遠心して集菌し、菌体を 100 µl の滅菌蒸留水で再懸濁し選択用の寒天培地 (S D 培地: 20 µg/ml ヒスタジン塩酸塩、0.67% アミノ酸非含有イーストニトロゲンベース (Difco)、2% グルコースに 2% の寒天を加えたもの) にまいた。30℃ で数日培養した後、生じたコロニーについて、実施例 4 に示す方法で H S A 断片の発現を検出することにより各々の H S A 断片を発現するプラスミドを含む AH22 (pJDB-ADH - nHSA) と AH22 (pJDB-

ADH - tHSA) を得た。

実施例 4. H S A 断片の発現

前記の形質転換体 AH22 (pJDB-ADH - nHSA) 及び AH22 (pJDB-ADH - tHSA) を 5 ml の Y P D 培地で 30℃ で 24 時間培養した。

細胞外に分泌された H S A 断片の検出は以下のようにして行った。培養液を 10000rpm、5 分間遠心した後の上清を 800 µl 分取し、エタノール 800 µl を加え氷中で 30 分間放置した。これを 12000rpm、5 分間遠心し、得られた沈澱を遠心エバポレーターで乾固させた後 SDS-PAGE 試料用緩衝液 (2% SDS、5% 2-メルカプトエタノール、7% グリセロール、0.00625% ブロムフェノールブルー、0.0625M Tris-HCl 緩衝液 pH 6.8) 20 µl に溶かし、5 分間煮沸した。この試料 10 µl を分離ゲル濃度 4-20% の SDS-ポリアクリルアミドゲルにより電気泳動 (Laemmli の方法: Nature (London) 277, 680 (1970)) した後、クマシーブリリアントブルー (CBB) により染色した。

また、同様に行った電気泳動後のゲルについて、

以下に示すようにウェスタンブロッティングを行った。すなわち、SDS-PAGE終了後のゲルをブロッティング装置(TEFCO社、Model:TC808)によりニトロセルロースフィルター(Bio-rad 社、Trans-blot®)にブロッティングした。ブロッティング終了後、フィルターを3%のゼラチンを含むTB S液(20mM Tris-HCl (pH7.5)、0.5M NaCl)で30分間処理した後、TTBS液(0.05%のTween20を含むTB S液)にて5分間の洗浄をTTBS液をかねて2回行った。次に、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗HSA抗体(カッセル社)を1%ゼラチンを含むTTBS液で1000倍に希釈した溶液中にフィルターを移し、1時間処理した。フィルターをTTBS液で2回、TB S液で1回、それぞれ5分間洗浄した後、0.015% H_2O_2 、0.05% HRP-カラデペロブメントリジェント(Bio-rad 社)、20%メタノールを含むTB S液にフィルターを移して15分間反応させた。反応終了後はフィルターを水で洗浄した。

菌体内に蓄積したHSA断片の検出は以下のよ

うに行った。すなわち、培養液 300 μ l を5000rpm、5分間遠心して集菌し、菌体を30 μ l のSDS-PAGE試料用緩衝液に懸濁し、100℃で10分間煮沸した。この試料10 μ l を上と同じ方法で電気泳動してウェスタンブロッティングを行った。

クマシーブリリアントブルー(CBB)染色の結果を第4図に示す。この図において、レーン1はHSA標準、レーン2及び6は分子量標準、レーン3はAH22(pJDB-ADH-mHSA)の発現生成物、レーン4は宿主AH22の培養物、そしてレーン5はAH22(pJDB-ADH-mHSA)の発現生成物、についての結果を示す。またウェスタンブロッティングの結果を第5図に示す。この図中、レーン1は宿主AH22の培養物、レーン2はAH22(pJDB-ADH-mHSA)の培養上清、レーン3はAH22(pJDB-ADH-mHSA)の培養上清、レーン4はHSA標準、レーン5はAH22(pJDB-ADH-mHSA)の培養細胞内蛋白質、レーン6はAH22(pJDB-ADH-mHSA)の培養細胞内の蛋白質、そしてレーン7は宿主AH22の細胞内蛋白質、についての結果を示す。

図に示すようにミニHSAは菌体外に分泌され、SDS-PAGEで分子量約35000のバンドとして同定された。しかし、短縮HSAは培地中に少量分泌され、菌体内に多量蓄積していた。

実施例5. ミニHSAの精製及び分析

前記の形質転換体AH22(pJDB-ADH-mHSA)を、グルコース5%を含むYPD培地(1%酵母エキス(Difco)、2%バクトペプトン(Difco)、5%グルコース)4 ℓ で30℃で40時間培養した。この培養液1500 μ lを0℃に冷却し、これに-20℃のエタノールを1500 μ lを加えた後0℃で30分間攪はんした。12000rpm、15分間の遠心により得られた沈澱を、30 μ lの100mM Tris-HCl緩衝液pH8.0に溶解した後、100 μ lの10mg/ μ l RNaseA(熱処理済)を加え室温で15分間処理した。これを750mM NaCl、10mMリン酸ナトリウム緩衝液pH6.9に対して一晚透析した後、18000rpmで10分間遠心して上清を得た。この上清を高速液体クロマトグラフィーのヒドロキシアパタイトカラム(Tonen Hydroxyapatite TAPS-052110 (ϕ 21 \times 100mm))にかけて、流速

3 μ l/min、60分間の10mM~200mMのリン酸濃度勾配により溶出した。ミニHSAのピークの同定は280nmの吸光度、及びSDS-PAGEにより行った。

得られたミニHSAのピークを水に対して透析した後、凍結乾燥し、さらに3 μ lの500mM NaCl、50mM Tris-HCl pH8.0、0.05%NaN₃に溶解した。この試料をSephacryl S-200(Pharmacia社、super fine grade(1.6 \times 90cm))のゲル濾過カラムにかけ、試料の溶媒と同じ溶液により、流速8.6 μ l/hrで溶出した。ミニHSAのピークの同定は上と同様に行った。次に、得られたミニHSAのピークを高速液体クロマトグラフィーの逆相カラム(TSK gel, phenyl-5PW RP(4.6 \times 76mm))にかけ、0.1%トリフルオロ酢酸存在下で流速1 μ l/min、60分間の0%~70%のアセトニトリル濃度勾配により溶出した。280nmの吸光度により同定した結果ミニHSAは2つのピークとして検出されこれらのピークを最終精製標品とした。

ミニHSAのN末端アミノ酸配列の同定

精製したミニHSAの試料を凍結乾燥した後、

トリフルオロ酢酸に溶解し、アミノ酸配列自動分析機 (Applied Biosystems社、Protein Sequencer 477A) によりN末端アミノ酸配列を同定した。アミノ酸配列自動分析機により同定された2つのミニHSAのN末端アミノ酸配列はともに以下の通りであった。

Asp-Ala-Hys-Lys-X-Glu-Val-Ala-

この配列は成熟HSAのN末端アミノ酸配列と同一であり、ミニHSAの発現、分泌の際にも天然のHSAと同じプロセッシングが行われていることがわかった。

ミニHSAのC末端のアミノ酸の同定

上で精製したミニHSAの試料 (約1nmol) を加水分解用試験管に入れて凍結乾燥した後、無水ヒドラジン (Ardlich社) 50μlを加えて、減圧下で100℃、5時間反応させた。室温に冷却した後、減圧により過剰のヒドラジンを除去し、さらに減圧デシケーター中で一晩乾燥した。この試料について、アミノ酸自動分析機 (日本電子、JLC-300) を用いてアミノ酸分析を行い、C末端アミノ

酸を同定した。また、上の試料を塩酸加水分解した後アミノ酸分析を同様に行い、試料を定量してC末端アミノ酸の回収率を求めた。この結果、ミニHSAのC末端アミノ酸は、ヒドラジン分解法により2本の精製ピークともProと同定された。構築されたミニHSAはC末端にProが存在するべきなので、この結果はそれと矛盾しないものである。

ミニHSAのアミノ酸組成分析

上で精製したミニHSAの試料 (約100pmol) を試料用試験管に入れて凍結乾燥した後、PICO-TAG(TM) ワークステーション用反応バイアルに入れた。この反応バイアルに定沸点塩酸 (和光純薬、精密分析用) 500μlを入れて、減圧下、110℃で加水分解した。反応時間は24、48、72時間とした。加水分解終了後、試料用試験管内の塩酸を減圧下で除去し、得られた試料のアミノ酸組成を、アミノ酸自動分析機 (日本電子、JLC-300) を用いて分析した。

この結果を次の表に示す。

ピーク1 (小ピーク)

アミノ酸	実験値	理論値
Ala	35.0	35
Arg	12.8	14
Asx	31.9	31
Cys	ND	19
Glx	45.5	42
Gly	7.8	7
His	11.4	10
Ile	4.9	5
Leu	29.6	32
Lys	28.3	28
Met	3.0	3
Phe	16.9	17
Pro	11.4	12
Ser	10.9	12
Thr	11.7	12
Trp	ND	1
Tyr	7.3	8
Val	14.7	15

ND = 未決定

ピーク2 (大ピーク)

アミノ酸	実験値	理論値
Ala	35.0	35
Arg	13.4	14
Asx	31.7	31
Cys	ND	19
Glx	45.3	42
Gly	7.5	7
His	11.0	10
Ile	5.1	5
Leu	30.0	32
Lys	28.0	28
Met	2.6	3
Phe	17.0	17
Pro	12.0	12
Ser	11.7	12
Thr	11.8	12
Trp	ND	1
Tyr	7.6	8
Val	14.8	15

ND = 未決定

前記の表から明らかなごとく、得られた実験値は理論値とはほぼ等しく、また、上に示したN末端アミノ酸配列及びC末端アミノ酸の結果をあわせると、発現分泌されたミニHSAは構築された通りの構造であった。

参考例1. 正常ヒト血清アルブミンA cDNAを含むクローンのスクリーニング

正常ヒト血清アルブミンA cDNAを含むクローンのブランクハイブリダイゼーションによるスクリーニングのため米国CLONTECH社の λ gt11をベクターとして作成されたヒト肝cDNAライブラリーを用いた。 λ gt11組換え体ファージを大腸菌Y1090を宿主として感染させ、形質転換ブランク合計 5.5×10^5 個をLB寒天培地(ルリア培地+1.5%寒天)上に形成させ組換えDNAをメンブランフィルター(Amersham社Hybond-N)に移した後、 32 P放射性同位元素で標識した合成オリゴヌクレオチド3種(比活性 $\geq 10^7$ cpm/ μ g)をプローブとして用いスクリーニングした(Benton & Davis Science 196,180-182(1977))。この3種のプロ

ーブは各々Lawnら(Nucleic Acids Res 9, 6103-6114(1981))によって報告されたヒト血清アルブミンcDNAの配列のうち5'非翻訳領域(翻訳開始のATGコドンより12ヌクレオチド上流からATGコドンの前のヌクレオチドまでの部分)と翻訳領域(アミノ末端のメチオニンコドンすなわちATGより9番目のアミノ酸ロイシンをコードする部分)を含むもの(HSA-1)、248番目のグリシンから260番目のロイシンをコードするもの(HSA-2)、並びに576番目のバリンからカルボキシル末端585番目のロイシンをコードする部分とそれに続く6ヌクレオチドから成る3'-非翻訳領域を含むもの(HSA-3)と同じ配列である。このプローブの合成は自動DNAシンセサイザーにより行い、標識は(γ - 32 P)ATPとポリヌクレオチドキナーゼを用いて行った。HSA-2で陽性のシグナルを与えた200個の λ gt11クローンのうち4個のクローンからDNAを調製(BlattnerらScience 202,1279-1284(1978))し、これをEcoRI酵素で消化し、消化物のサザンブロット

をHSA-2プローブとハイブリダイズさせた(Southern, E., J. Mol. Biol. 503-517(1975))。ハイブリダイズしたフラグメントは3つのクローンから得られ各々1.8kb, 1.4kb, 1.3kbの長さであった。このうち1.8kbと1.3kbの長さのフラグメントをpUC19ベクターにサブクローニングした。このサブクローンをHSA-1とHSA-3を各々プローブとしてコロニーハイブリダイゼーション(GrunsteinおよびHogness Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3961-3965(1975))によりスクリーンした。この結果HSA-3のみにハイブリダイズするクローン λ gt11(HSA-I-A)が得られた。このクローンの各種DNA断片を塩基配列決定用ベクターM13mp18およびmp19 RF-DNA上に移し、ダイデオキシヌクレオチドターミネーション法(Sanger, F., Nicklen, S. およびCoulson, A. R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467(1977))により塩基配列を決定した。一方HSA-2をプローブとして行った λ gt11クローンのブランクハイブリダイゼーションにおいて陽性のシグナルを与えたクロー

ーンのうち20個についてHSA-1をプローブとして再びブランクハイブリダイゼーションを行い、1個の陽性のシグナルを与えるクローン λ gt11(HSA-II)を得た。これからファージDNAを調製しEcoRI消化物についてHSA-1をプローブとして用いサザンハイブリダイゼーションを行い1.25kbのフラグメント(HSA-II)がプローブとハイブリダイズすることを確認した。このフラグメントの塩基配列をダイデオキシヌクレオチドターミネーション法で決定した。HSA-IIはHSA-3プローブとはハイブリダイズしなかった。この結果HSA-IIはカルボキシル末端側をコードする部分を欠き、HSA-I-Aはヒト血清アルブミンのアミノ末端側をコードする部分を欠き、さらに304番目のセリンをコードするコドン(TCA)が翻訳終止コドンのオバールコドンTGAに変化していることがわかった。この2つのDNAフラグメントの制限酵素地図を第6図に示す。酵素認識サイトの正確な位置は最終的な塩基配列から得た。

参考例2 プラスミド pUC-HSA-CHの作製(第7図)

成熟正常ヒト血清アルブミンAの全体をコードするDNAを含むプラスミド pUC-HSA-CHを次の様にして作成した。

ヒト肝cDNAライブラリーから得たHSA cDNAを含むクローンλgt11(HSA-Ⅱ)からEcoRIとXbaI消化によって生じるフラグメントを調製し、これをpUC19プラスミドのEcoRIとXbaIとの二重消化物のうち大きな方のフラグメントとT4 DNAリガーゼを用いて結合させ組換えプラスミド pUC-HSA-EXを構築した。

このプラスミドからAhaⅢとSalⅠの二重消化により生じる小さい方のフラグメントを精製した。このフラグメントは成熟正常ヒト血清アルブミンA蛋白質の12番目のLeuから356番目のThrまでをコードする。成熟正常ヒト血清アルブミンA蛋白質をアミノ末端からコードする遺伝子を構築するために5'端に相当するDNA配列を、化学合成したフラグメント2本をアニールすること

により作成した。この合成DNA配列はアルカリ性ホスファターゼのシグナルペプチドをコードするDNA配列と融合できるようにHpaⅡ及びClaⅠ酵素切断によって生じる粘着末端配列CGを5'端側に有し、成熟正常ヒト血清アルブミンA蛋白質の1番目のアミノ酸Aspから11番目のアミノ酸Pheをコードする配列を有している。このアニールさせたDNA配列にT4ポリヌクレオチドキナーゼを作用させて5'端をリン酸化させたものと、pUC-HSA-EXから生じたAhaⅢ/SalⅠ二重消化物を混合し、さらにこれに大腸菌のマルチコピークローニングベクターの代表的なものの一つpAT153(Amersham社製、Twigg, A.J.及びSherratt, D. Nature 283 216-218, 1980)のClaⅠ/SalⅠの二重消化物のうち大きなフラグメントと混合しこの3者をT4 DNAリガーゼにより結合させ、組換えプラスミド pAT-HSA-CXを得た。このプラスミド上で正常ヒト血清アルブミンAの1位のアミノ酸Aspから11位のアミノ酸PheをコードするDNA配列が繋がった。pAT-HSA

-CXをEcoRI/XbaIで二重消化し、正常ヒト血清アルブミンAのAsp1~Phe356をコードするDNA配列を含む小さい方のフラグメントを得た。

一方HSA-Aのカルボキシル末端側をコードするcDNAは、ヒト肝cDNAライブラリーから得たクローンλgt11(HSAⅠ-A)から外来cDNA配列の挿入されているEcoRIフラグメントを調製し、pUC18プラスミドのEcoRIサイトに挿入することにより組換えプラスミド pUC-HSA-Ⅰ'中にクローニングした。これによりHSA-Aの358番目のアミノ酸Leuからカルボキシル末端の585番目のLeuをコードし、さらに3'側の非翻訳領域62ヌクレオチドを含むXbaI/HindⅢの二重消化物を調製した。これをpAT-HSA-CXより得たEcoRI/XbaI二重消化物及びpUC19のEcoRI/HindⅢ二重消化物のうち大きなフラグメントと混ぜてT4 DNAリガーゼにより連結反応を行い、成熟正常ヒト血清アルブミンAのcDNA全体を含む組換えプラスミド pUC-HSA-CHを得た。

参考例3 プレプロ配列をコードするDNAの合成及びプラスミド pUC-HSA-ENの作製(第7図)

次の配列を有する4種類のオリゴヌクレオチド:

1. AATTCATGAAGTGGCTTACTTTTCATCTCTTTGTTGTT
2. AGAACAAGAACAACAAGAGATGAAAGTAACCCACTTCATG
3. CTGTGTTCTCTTCTGCTTACTCTAGAGGTGTTTTCAGACG
4. CGCGTCTGAAAACACCTCTAGAGTAAGCAGAAG

を、Matteucci, M.D.及びCaruthers, M.H., Tetrahedron Letters 21, 719(1980)に記載されているホスホアミダイト法により、自動DNA合成機(Applied Biosystems モデル380B)を用いて合成した。オリゴヌクレオチド断片をT4ポリヌクレオチドキナーゼにより5'-リン酸化した後、アニリングせしめ、次にT4 DNAリガーゼにより連結して、プレプロ配列をコードする一つの二本鎖DNAを得た。

次に、正常ヒト血清アルブミンAのcDNAを含むプラスミド pUC-HSA-CH(参考例2)を制限酵素EcoRI及びClaⅠで二重消化して大きい方のフ

ラグメントを得、これを前記の合成DNAとT4 DNAリガーゼにより結合させプラスミドpUC-HSA-EXを作成した。

参考例4. Met(123)-Ala(151)をコードするDNAの合成(第8図)

5' 端にBamHI付着端をもち、3' 端付近にHpaII(MspI)認識配列をもち、その二本鎖部分がヒト血清アルブミンのMet(123)-Ala(151)を完全にコードする遺伝子断片の構築を以下のように行った。大腸菌での発現を効率よくするために大腸菌で高い効率で発現される遺伝子によってよく使用されるコドン(preferential codons)をできるだけ多く含むよう配列をデザインした。これらのコドンに対するtRNA種は一般に大腸菌内に多量に存在しており(たとえば、Ikemura, T. J. Mol. Biol. 151, 389-409(1981); Gouy, M. & Gautier, C. Nucleic Acids Res. 10, 7055-7074(1982))、翻訳効率に影響することが期待される。

次の4種類のオリゴヌクレオチド:

5' -GATCCATGTCACCGCTTTCCACGACAACGAAGAAACC
TTCC-3'

5' -AGGTATTTTTTCAGGAAGGTTCTTCGTTGTCGTGGAA
AGCGGTGCACATG-3'

5' -TGAAAAAATACCTGTACGAAATCGCTCGTCACCCG
TACTTCTACGCTCCGG-3'

5' -CGAACAACAGCAGTTCCGGAGCGGTAGAAGTACGGGTGA
CGACGAGCGATTTCGTAC-3'

をCaruthersら(Matteucci, M. D. 及びCaruthers, M. H. Tetrahedron Letters 21, 719(1980))により開発されたホスホアミダイト法を応用した自動合成機(Applied Biosystems モデル380B)を用いて合成した。合成されたDNA鎖(約30pmoles) 50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10 mM MgCl₂, 5 mM ジチオスライトール及び0.2 mM ATPを含有する溶液(50 µl)中で6単位のT4ポリヌクレオチドキナーゼ(宝酒造)存在下で37℃、60分間処理することにより5'-端をリン酸化した。

リン酸化されたフラグメント4本を混ぜ100℃の水浴中に5分間保温しついで室温で放冷してアニリングを行った。2 µlのT4 DNAリガーゼ(800単位、宝酒造)を加えて16℃で一晩保温しフラグメント間を連結して二本鎖フラグメントとした。

次にこの二本鎖フラグメントをHpaII(MspI)で切断して96bpのフラグメントを得た。

参考例5. ヒト血清アルブミン断片Met(123)-Pro(303)をコードするDNA断片の作製(第8図)

正常ヒト血清アルブミンのアミノ末端側をコードする部分を欠き、さらに304番目のセリンをコードするコドンが翻訳終止コドンに変化している配列を含むλgt11ヒトcDNAクローン(HSA-1A)(参考例1:第6図)をEcoRIにより切断してヒト血清アルブミンcDNA部分を取り出し、これをプラスミドpUC19のEcoRI部位に挿入してプラスミドpUC-HSA-1を作製した。

pUC-HSA-1をPstIで切断し、生じた5' 端のリン酸基をバクテリアアルカリ性ホスファターゼで処理して除去した後、HpaII(MspI)で切断して750bpのフラグメントを切り出した。この750bpのフラグメントを実施例1において合成した96bpのフラグメントとT4 DNAリガーゼでHpaII(MspI)の付着末端同士の間合を利用して結合し

た後、pUC19のBamHIとPstIの二重消化物の大きい方のフラグメントとT4 DNAリガーゼにより連結しpSALIIプラスミドを得た。

参考例6. ポリA配列及びAATAAAシグナル配列の挿入(第9図)

ヒト血清アルブミンAのcDNAの3' 側領域を含有するλgt11(HSA-1A)(参考例1、第6図)をEcoRIにより消化してヒト血清アルブミンAのcDNAを含有するDNAフラグメントを得、これをEcoRIにより切断したプラスミドpUC18に連結してプラスミドpUC-HSA-1'を得た。

参考例7. プラスミドpAT-nHSAの構築(第9図)

アレプロヒト血清アルブミンA cDNAの5'-非翻訳領域とコーディング領域の前半部分を含むプラスミドpUC-HSA-EX(参考例2)からアレプロヒト血清アルブミンA cDNA部分をEcoRIとXbaIによる二重消化によって切り出し、ヒト血清アルブミンA cDNAのコーディング領域の後半部分と3'-非翻訳領域を含むプラスミドpUC-HSA-1'(参考例6)から切り出したXbaI-HindIII

フラグメントおよびpAT153ベクター (Amersham社製: Twigg, A. J. 及び Sheratt, D., Nature 283, 216-218, 1980) から切り出したEcoRI-HindIIIフラグメントとを連結し、プラスミド pAT-HSA-EHを得た。ブレプロヒト血清アルブミンAをコードするcDNA配列の酵母菌由来の強力なプロモーター配列と隣接させるためにcDNA配列の5'末端に付けられているEcoRIサイトとブレプロヒト血清アルブミンAのシグナルペプチドをコードする配列中三番目のアミノ酸Trpから5番目のアミノ酸Thrのコードにわたって存在するBstEIIサイトを利用した。ブレプロヒト血清アルブミンAの5'-非翻訳領域とシグナルペプチドのアミノ末端から3個のアミノ酸をコードする配列とを含むEcoRI-BstEIIフラグメントをpAT-HSA-EHから切除した。残った大きなDNAフラグメントを5'末端にEcoRI粘着末端配列を、3'末端にBstEII粘着末端配列を有し、ブレプロヒト血清アルブミンAのシグナルペプチドの三番目のアミノ酸までをコードすることのできる合成DNAフラグメン

ト:

EcoRI BstEII
5' - AATTCATGAAGTGG
 GTACTTCACCCATTG - 5'

と連結した。すなわち、この合成フラグメントをT4ポリスクレオチドキナーゼで処理することにより5'-末端をリン酸化し、T4 DNAリガーゼによりこの連結を行い、天然型のブレプロヒト血清アルブミンA cDNAを含むプラスミド pAT-nHSAを作製した。

参考例B. プラスミド pAT-nHSA-Aの作製 (第1図)

pAT-nHSA (参考例7) をブレプロヒト血清アルブミンA cDNA配列の5'端にあるEcoRIサイトで切断し、ここに両末端がEcoRI粘着末端配列で内部にXhoIサイトを含む合成リンカー

EcoRIXhoIEcoRI
5' - AATTCTCGAG
 GACCTCTTAA - 5'

を挿入しプラスミド pAT-X-nHSAを作製した。

この pAT-X-nHSA中のブレプロヒト血清アルブミンA cDNA配列の3'末端に隣接するpAT153プラスミド由来のHindIII-BamHIフラグメントを切り出し、pUC-HSA-1'より切り出したブレプロヒト血清アルブミンA cDNAの3'側配列でポリAシグナル及びポリA配列を含む領域とpUC18ベクター由来の領域とを含むHindIII-BamHIフラグメントと置換しプラスミド pAT-nHSA-Aを作製した。

4. 図面の簡単な説明

第1-1~1-2図はミニHSA発現プラスミドpJDB-ADH-nHSAの作製過程を示す。

第2-1~2-3図は短縮HSA発現プラスミドpJDB-ADH-tHSAの作製過程を示す。

第3図はプラスミドpUC-nHSAの作製過程を示す。

第4図は、AH22 (pJDB-ADH-nHSA) (レーン3) 及びAH22 (pJDB-ADH-tHSA) (レーン5) からの発現生成物のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動図であり、クマシーブリアントブルーに

より蛋白質バンドを染色してある。レーン1は精製ヒト血清由来ヒト血清アルブミン、レーン2及び6は分子量標準であり、ホスホリラーゼB (分子量94,000)、ウシ血清アルブミン (分子量67,000)、オバルブミン (分子量43,000)、炭酸脱水素酵素 (分子量30,000)、大豆トリプシンインヒビター (分子量20,000) 及びラクトアルブミン (分子量14,400) でありレーン4はHSAフラグメント発現プラスミドを含まない宿主AH22株培養液中の蛋白質の電気泳動図である。

第5図は、AH22 (pJDB-ADH-nHSA) の培養上清 (レーン2) 及び細胞内蛋白質 (レーン5)、AH22 (pJDB-ADH-tHSA) の培養上清 (レーン3) 及び細胞内蛋白質 (レーン6)、AH22の培養上清 (レーン1) 及び細胞内蛋白質 (レーン7)、それに精製ヒト血清由来ヒト血清アルブミン (レーン4) のウェスタンブロット図であり、抗ヒト血清アルブミン抗体と反応した蛋白質を示す。

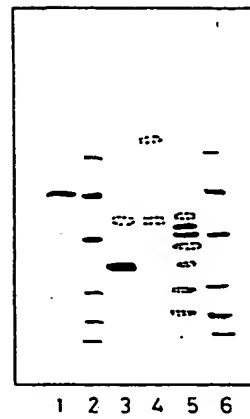
第6図はヒト血清アルブミンをコードするcDNAの制限酵素地図を示す。

第7図はプラスミド pUC-HSA-EH の作製過程を示す。

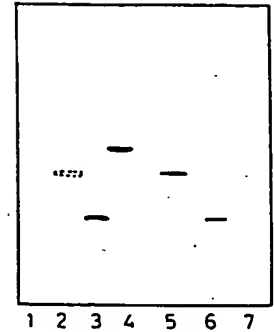
第8図はプラスミド pSAL II の作製過程を示す。

第9図はプラスミド pAT-nHSA の作製過程を示す。

第10図はプラスミド pAP-nHSA-A の作製過程を示す。



第4図



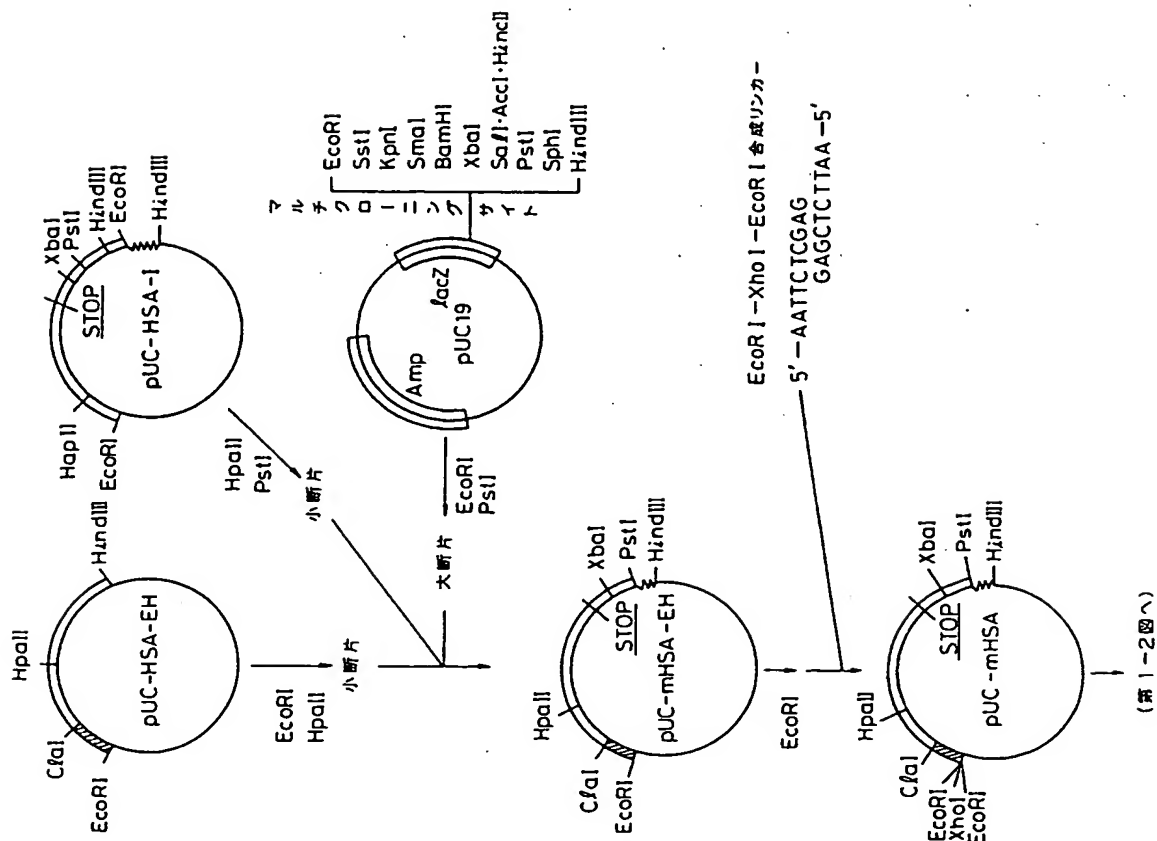
第5図

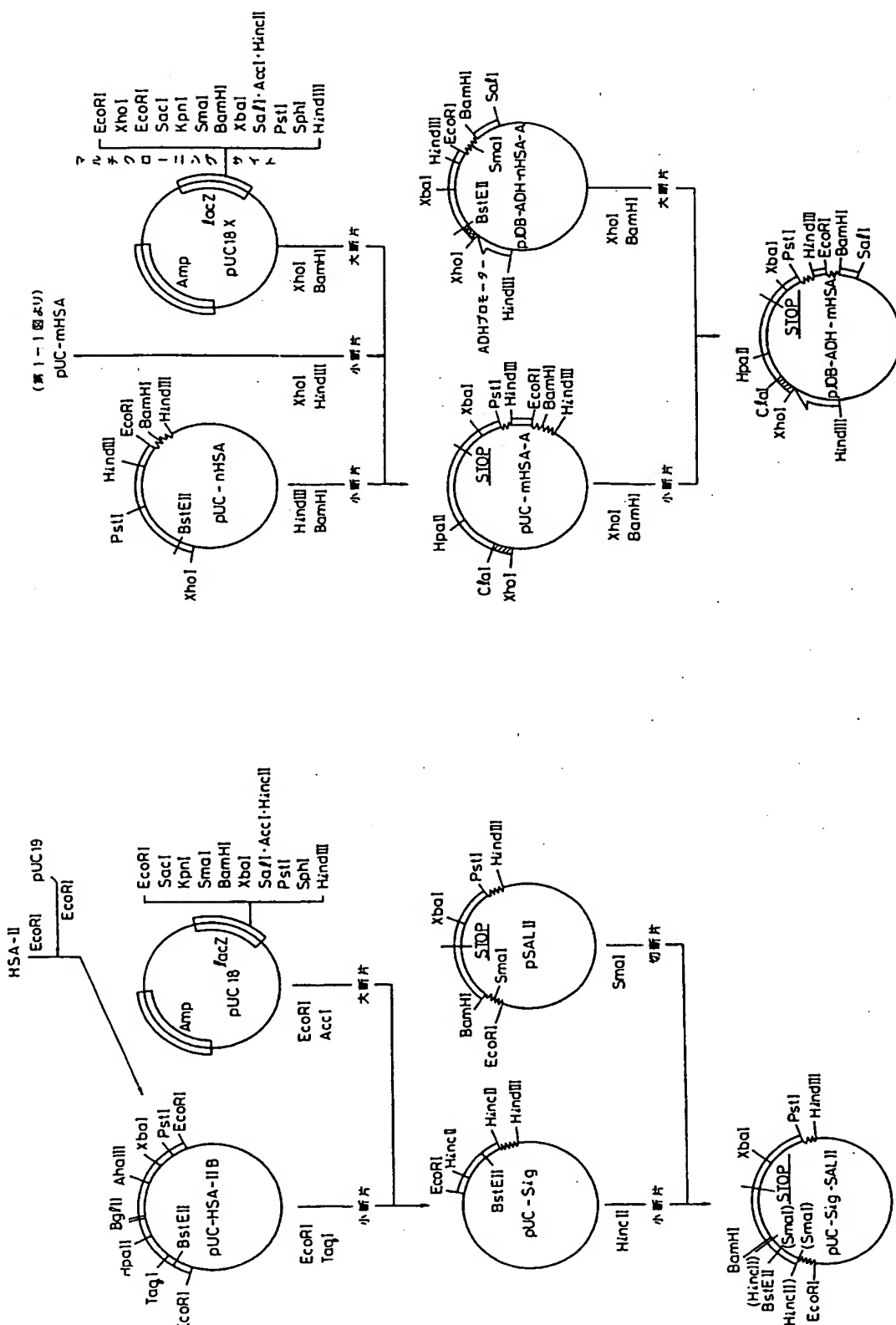
特許出願人

東 燃 株 式 会 社

特許出願代理人

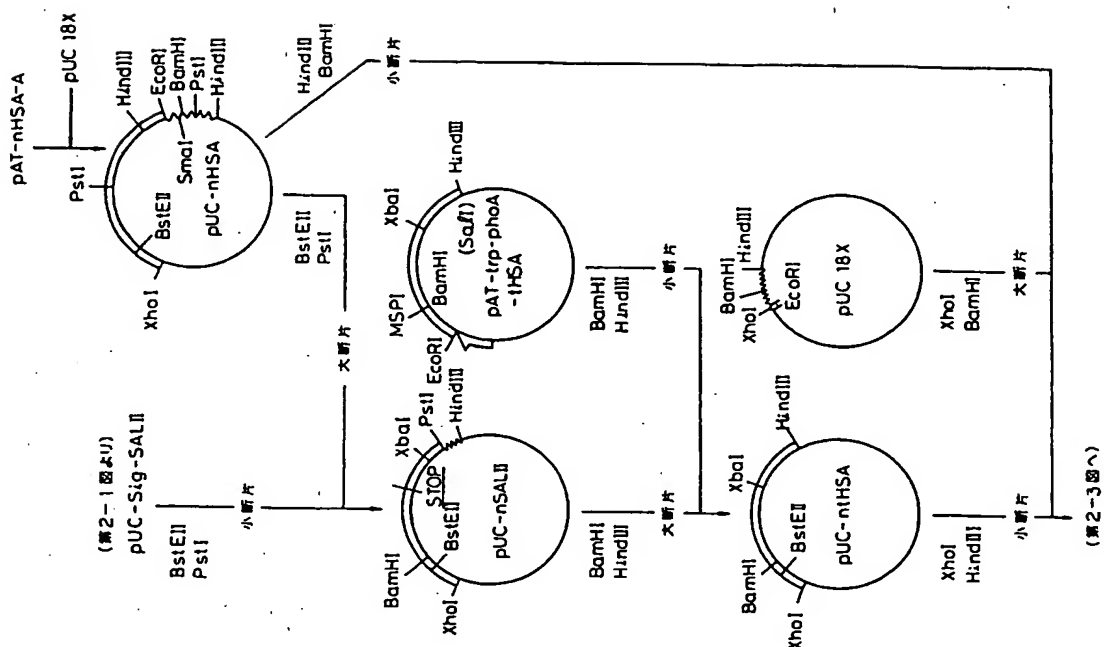
弁理士 青 木 朗
弁理士 石 田 敬
弁理士 福 本 積
弁理士 山 口 昭 之
弁理士 西 山 雅 也



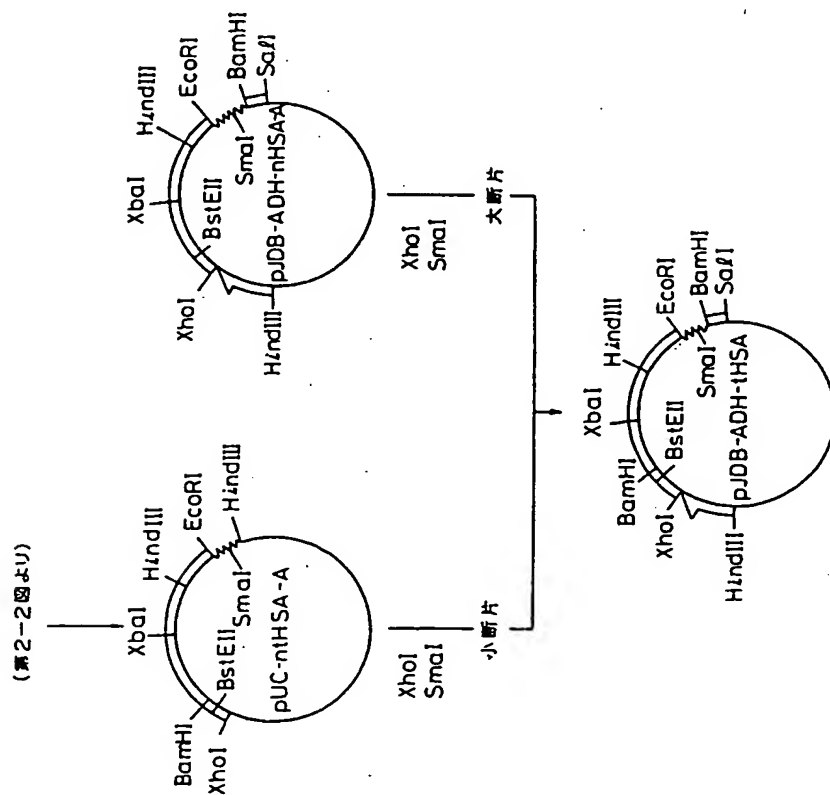


第1-2図

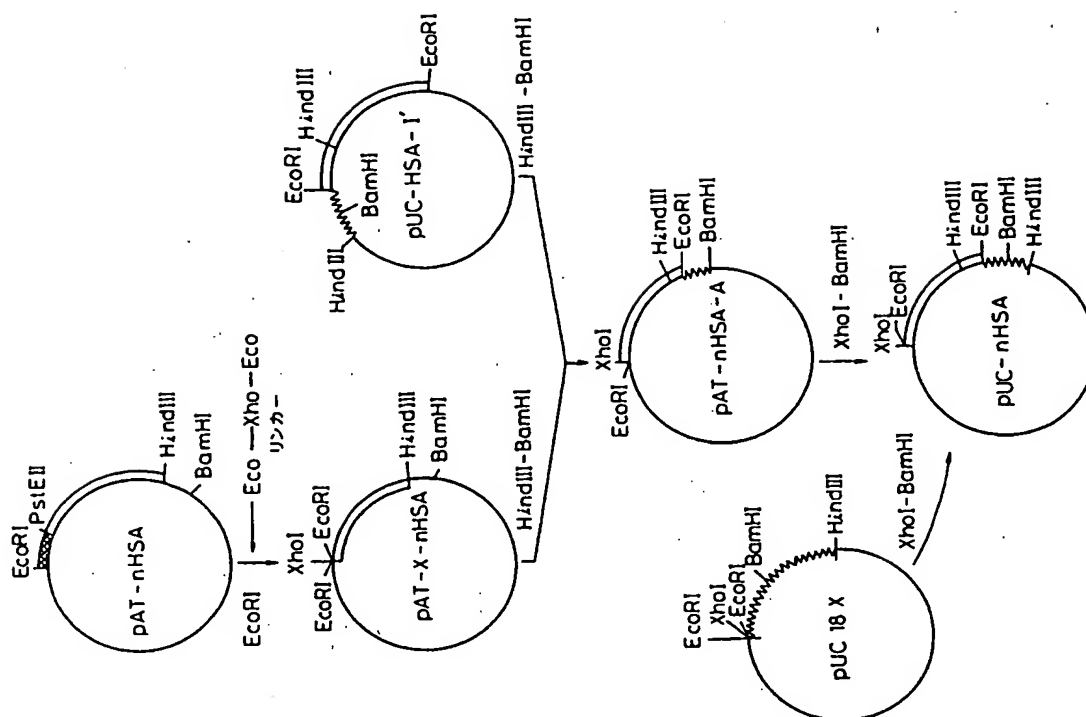
第2-1図



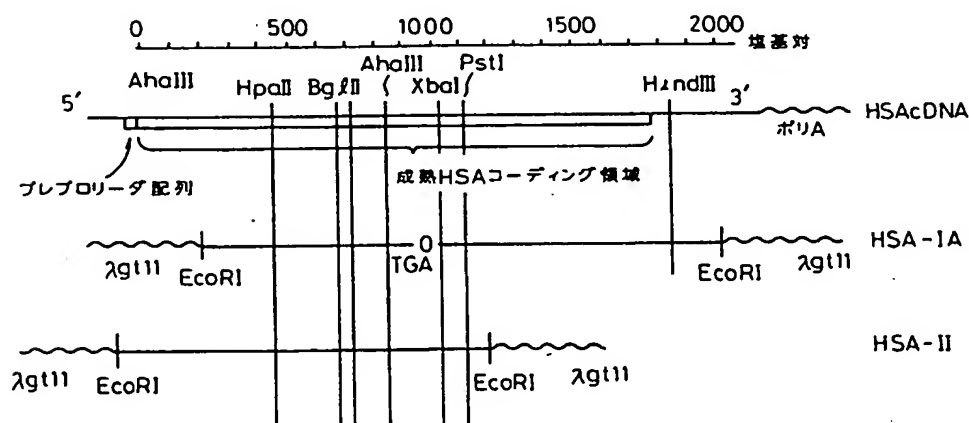
第2-2図



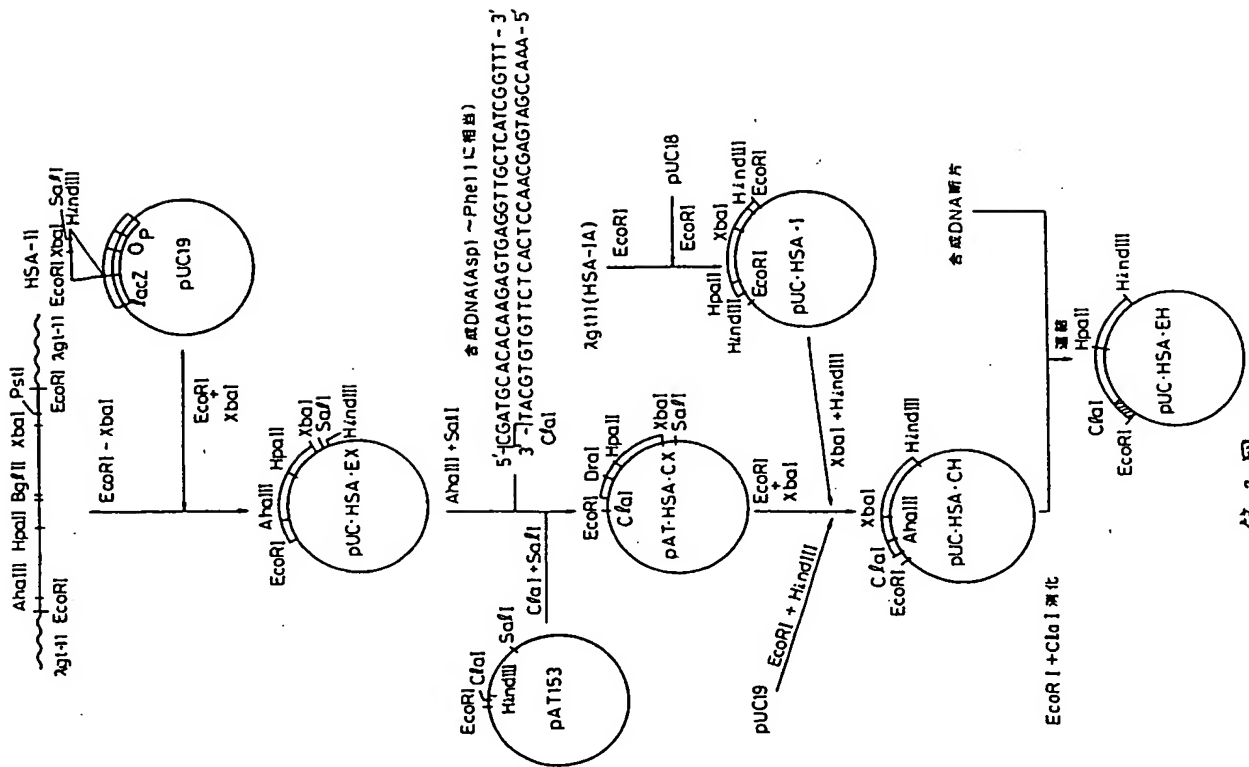
第2-3図



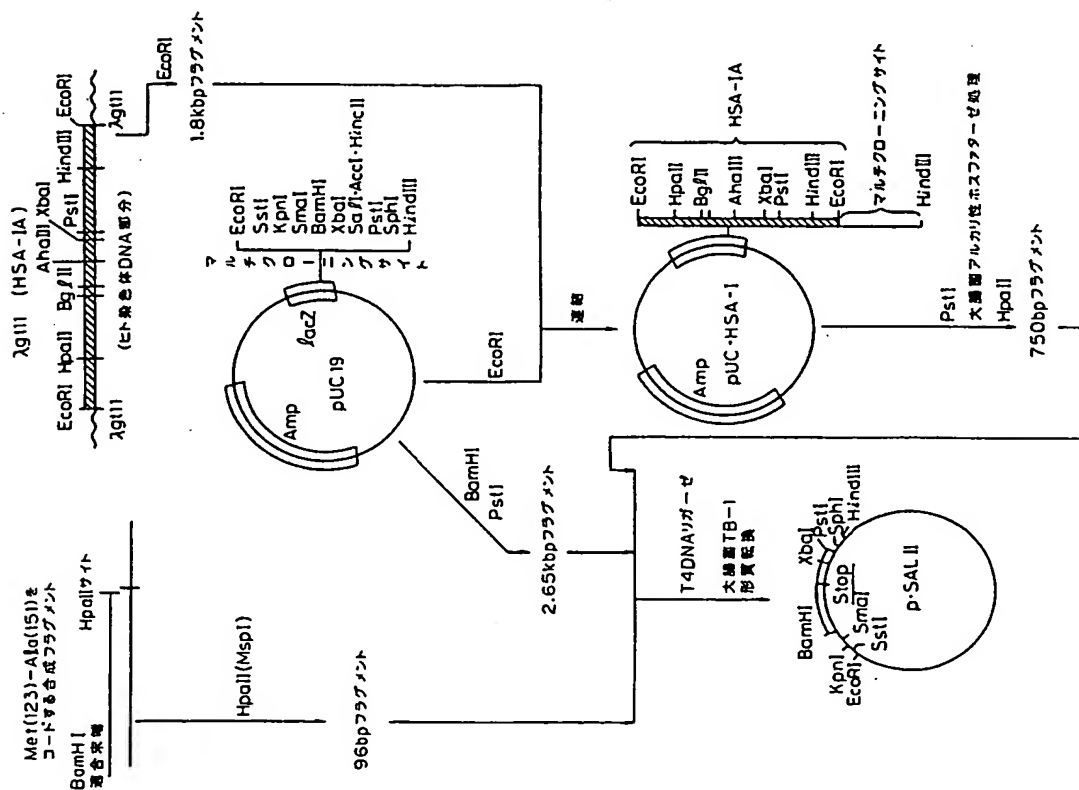
第 3 図



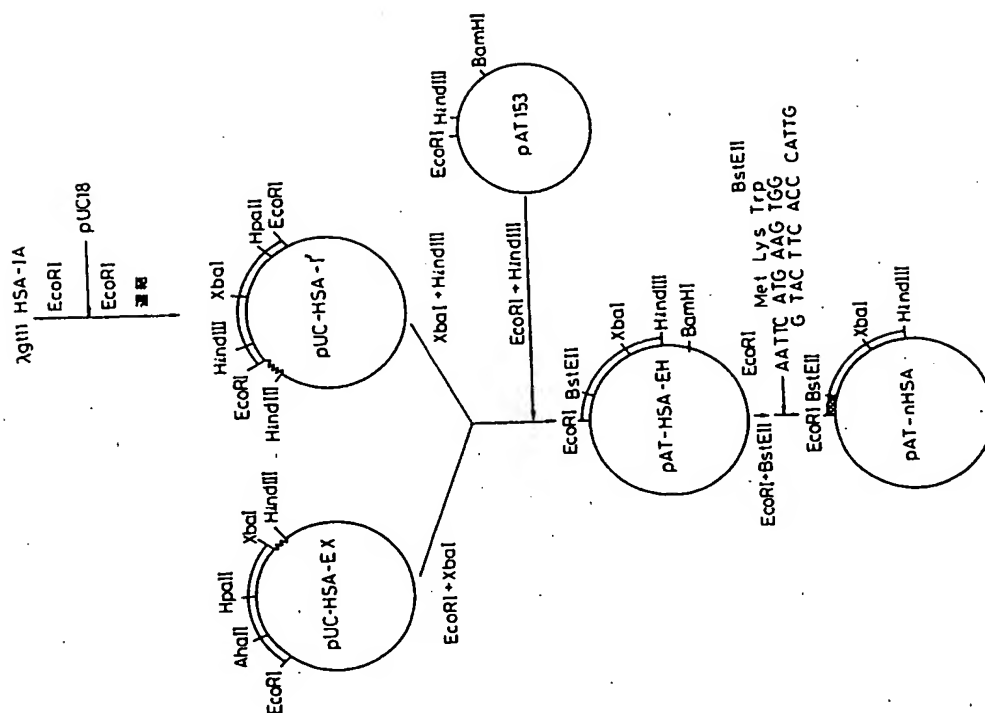
第 6 図



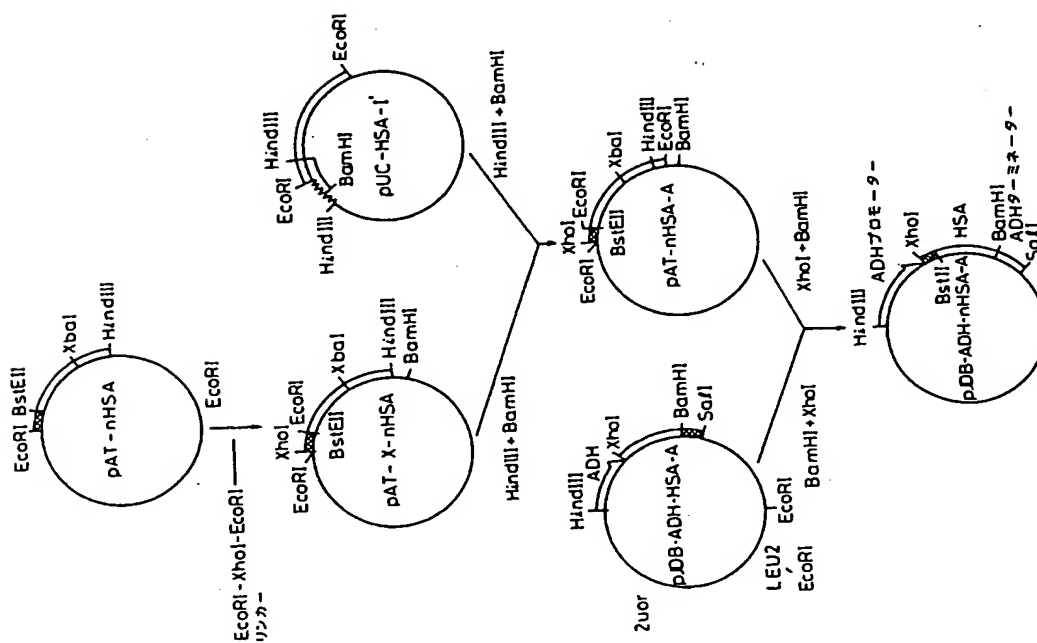
第7図



第8図



第 9 図



第 10 図

第1頁の続き

⑤Int. Cl. 5

C 07 K 15/16

C 12 N 1/19

C 12 P 15/62

C 12 P 21/02

//C 12 N 1/19

C 12 R 1:865)

(C 12 P 21/02

C 12 R 1:865)

識別記号

庁内整理番号

8619-4H

9050-4B

ZNA C

8214-4B

Japan Patent Office
Public Patent Disclosure Bulletin

Public Patent Disclosure Bulletin No.: 3-201987

Public Patent Disclosure Bulletin Date: September 3, 1991

Request for Examination: Not yet made

Number of Inventions: 13

Total Pages: 23

Int. Cl. ⁵ Identification Code	Internal File Nos.
C 12 N 15/14	
C 07 K 13/00	8619-4H
	8717-4B C 12 N 15/00

Title of Invention: Human serum albumin fragments

Patent Application No.: 1-344701

Patent Application Date: December 29, 1989

Inventor: Mitsuaki Yanagida
General Laboratory, Tonen Co., Ltd.
1-3-1 Nishi Tsurugaoka, Oi-cho,
Irima-gun, Saitama Pref.

" Noboru Maki
General Laboratory, Tonen Co., Ltd.
1-3-1 Nishi Tsurugaoka, Oi-cho,
Irima-gun, Saitama Pref.

" Masanori Suzuki
General Laboratory, Tonen Co., Ltd.
1-3-1 Nishi Tsurugaoka, Oi-cho,
Irima-gun, Saitama Pref.

Applicant: Tonen Co., Ltd.
1-1-1 Hitotsubashi,
Chiyoda-ku, Tokyo

Attorney: Akira Aoki, Esq.
and 4 others

(continued on last page)

Specifications

1. Title of Invention:

Human serum albumin fragments

2. Claims:

1. Human serum albumin fragments, lacking the C-end part of human serum albumin.
2. Fragments in accordance with Claim 1 which contain the amino acid sequence from the aspartic acid in the first position of human serum albumin to the proline in the 303rd position.
3. Fused proteins, consisting of human serum albumin fragments lacking the C-end part of human serum albumin and other polypeptides.
4. Fused proteins in accordance with Claim 3, which consist of signal peptides and propeptides of human serum albumin and the amino acid sequence from the aspartic acid in the first position of human serum albumin to the proline in the 303rd position.
5. Human serum albumin fragments, lacking the N-end part of human serum albumin.
6. Human serum albumin fragments in accordance with Claim 5 which contain the amino acid sequence from the

methionine in the 123rd position of human serum albumin to the leucine in the 585th position.

7. Fused proteins, consisting of human serum albumin fragments lacking the N-end part of human serum albumin and other polypeptides.
8. Fused proteins in accordance with Claim 7 which consist of signal peptides and propeptides of human serum albumin and the amino acid sequence from the methionine in the 123rd position of human serum albumin to the leucine in the 585th position.
9. DNA sequence which encode the protein fragments of Claims 1 and 5 and the fused proteins of Claims 3 and 7.
10. Plasmids which contain the DNA sequence of Claim 9.
11. Plasmids in accordance with Claim 10, which are expressing plasmids which contain control sequence for efficiently expressing the aforementioned DNA sequence in the host, on the upstream side of the said DNA sequence.
12. Hosts which are morphologically transformed by the plasmids of Claim 11.
13. A method of manufacturing human serum albumin protein fragments or fused proteins containing the said human

serum albumin protein fragments, characterized in that, by culturing the hosts of Claim 12, human serum albumin protein fragments or fused proteins containing these fragments are expressed, and when the fused protein fragments are expressed the said human serum albumin protein fragments are cut from the said fused proteins as desired.

3. Detailed Explanation of Invention:

Field of Use in Industry

This invention concerns protein fragments consisting of parts of human serum albumin. These protein fragments are expected to have applications as carriers in transportation and delivery systems of drugs, etc.

Conventional Technology

Human serum albumins are high-molecular-weight plasma proteins with a molecular weight of 66,458 which are synthesized in the human liver. In the body, they primarily have the important functions of regulating the osmotic pressure of the blood, bonding with various substances (e.g., fatty acids, metal ions such as Cu^{2+} and Ni^{2+} , bile bilirubin, many drugs, some water-soluble vitamins, etc.) and thus carrying them to target organs, supplying amino acids to tissues, etc. On the basis of these activities, human serum albumin is used in large quantities in the treatment of loss of albumin due to burns or gastritis,

etc.; hypoalbuminemia, which occurs when albumin synthesis is reduced by cirrhosis of the liver; hemorrhagic shock; etc. Serum albumins also play the role of bonding nonspecifically with many drugs and transporting them in the blood. It is thought that drugs which bond with albumins move through the body due to blood circulation and are eventually liberated from the albumins, pass through the capillary walls, and are dispersed, thus arriving at their sites of activity. Albumins have little toxicity and low antigenicity; they are easily decomposed in the body. They can be easily covalently bonded with drugs and formed into complexes. They have the advantages that they have excellent characteristics as substrates for drug delivery (drug carriers), and for many of them, bonding sites with various drugs have been determined or are suspected, so that they can be easily designed for the manufacturing of pharmaceutical preparations.

Fundamentally, almost all suspected bonding sites with many drugs are contained even in human serum albumin fragments, and are thought to be able to show activities as drug carriers. When used as carriers, etc., in transport and delivery systems for drugs, etc., from the point of view of limiting bonding ability with drugs, etc., it is predicted that it is more advantageous to use fragments of human serum albumin molecules, rather than the whole molecules.

In general, as methods for preparing fragments of proteins by cutting them, methods of using chemical substances such as cyan bromide or proteases such as trypsin, pepsin, etc. [to cut] proteins are known. However, in these methods, since the cutting sites are necessarily determined by the amino acid sequence of the proteins, it is not possible to cut them at any arbitrary desired site, and therefore it is not possible to obtain ideal protein fragments. Therefore, such fragments cannot be obtained either from human serum albumin.

Problems Which This Invention Seeks to Solve

In contrast to this, by using recombinant DNA technology, it is possible to synthesize human serum albumin fragments consisting of any desired parts in suitable host cells. Therefore, this invention seeks to provide human serum albumin protein fragments by recombinant DNA technology, based on making DNA which encodes the desired protein fragments of human serum albumin, as well as a method for manufacturing them.

More specifically, this invention concerns human serum albumin fragments lacking the C-end parts of human serum albumin and fused proteins composed of the said fragments and other polypeptides, as well as human serum albumin fragments lacking the N-end parts of human serum albumin and fused proteins composed of the said fragments and other polypeptides; DNA which encodes these protein fragments or

fused proteins; plasmids containing the said DNA; hosts morphologically transformed by the said plasmids; and a method for manufacturing human serum albumin protein fragments or fused proteins containing such fragments which is characterized in that, by culturing the aforementioned hosts, human serum albumin protein fragments or fused proteins containing these fragments are expressed, and when the fused protein fragments are expressed the said human serum albumin protein fragments are cut from the said fused proteins, in the host cells or in test tubes, as desired.

Concrete Explanation of Invention

The cDNA which encodes normal human serum albumin A has already been cloned (Public Patent Application No. 63-037453). Therefore, using this cDNA, it is possible to manufacture any desired fragments of normal human serum albumin A by genetic engineering methods.

This invention provides, as such fragments, (1) serum albumin fragments lacking the C-ends of human serum albumins and (2) serum albumin fragments lacking the N-ends of human serum albumins. For example, this invention provides, as examples of albumin fragments lacking the C-ends, albumin fragments which contain the amino acid sequence from the aspartic acid in the first position of human serum albumin to the proline in the 303rd position (these are sometimes called "mini-HSA"), and as examples of albumin fragments lacking the N-ends, albumin fragments which contain the

amino acid sequence from the methionine in the 123rd position of human serum albumin to the leucine in the 585th position (these are sometimes called "contracted HSA").

These two types of albumin fragments of this invention have the following characteristics.

The albumin fragments of this invention all contain the central parts of human serum albumins. This is because, up to now, 4 drug bonding sites have been discovered on the human serum albumin molecule which are contained within this central part (sites I-IV) [Sjïholm, I., Ekman, B. E., Kober, A., Ljugstedt-Pahlman, I., Seiving, B., and Sjïdin, T., Mol. Pharmacol. 16, 767-(1979)]; at these sites, several amino acid residual groups which play important roles in bonding drugs are known [Fehske, K. et al., Biochem. Pharmacol. 30, 688-(1981)], and almost all of these are concentrated in the central part.

Sjïholm et al. have investigated the bonding sites of many kinds of drugs by using microcytes with drugs uniformly dispersed in human serum albumins; they classify them as the diazepam site (site I), the digitoxin site (site II), and the warfarin site (site III). It also appears that, besides these, a tamoxifen site (site IV) and a bilirubin bonding site are present. Fehske et al. suspected that the amino acids which play important roles in the bonding sites of diazepam, warfarin, and bilirubin are, respectively, Lys195 and ^{His}~~His~~146; Arg145 and Trp214; and Lys199 and Lys240. On the other hand, the bonding sites for long-chain fatty acids

such as palmitates appear to be in the C-end region [Reed, R. G., Feldhoff, R. C., Clute, O. L. and Peters, T., Tr. Biochemistry, 14, 4578-(1975); Berde, C. B., Hudson, B. S., Simoni, R. D. and Sklar, L. A., J. Biol. Chem., 254, 391-(1979)]; if the human serum albumin fragments with the C-ends missing of this invention are used, long-chain fatty acids cannot be bonded, and the production of drug carriers which can bond with diazepam, warfarin, etc., becomes possible.

Human serum albumins are high-molecular-weight proteins composed of 585 amino acids; they have 35 cysteine residual groups in their molecules, among which only the cysteine residual group located closest to the N-end side (Cys-34) is present in a form which has a free SH group; the others form disulfide (S-S) bridges with each other; a total of 17 S-S bonds are formed in the molecule. It has recently been demonstrated that at least 2 enzymes [peptidylprolyl cis-trans isomerase and protein disulfide isomerase (PDI)] contribute to the process of forming higher-order (steric) structures of protein molecules; it is the latter, PDI, which plays an important role in forming S-S bridges. In the cells of mammals which produce serum albumins, the principal locations where PDI is known to be present are microsome fractions which contain microcytes. When human serum albumins are biosynthesized in prokaryotic cells, including coliform bacilli, the aforementioned reactions occur. There is no guarantee that correct S-S bridges will

be formed in the molecules; the Cys-34 may cause a thiol/disulfide exchange reaction to occur with the cysteine residual group in the molecule, producing a crossing of the S-S bridges and thus an isomer. Thus, when cysteine residual groups which have free SH groups are present, the efficiency with which proteins arise which take the normal steric form, which should be produced, is reduced, and the risk that proteins with abnormal steric structures will also be abnormal functionally becomes great. In contrast to this, in the albumin fragments of this invention, lacking the N-end part, which contain the amino acid sequence from the methionine in the 123rd position to the leucine in the 585th position, the Cys34 is removed, together with the other 6 cysteines located on the amino end side, and this risk is lessened.

In this invention, as typical examples of the 2 aforementioned types of albumin fragments, 2 kinds of albumin fragments with specific amino sequence ranges are mentioned; the 2 types of albumin fragments have the characteristics mentioned above, and all albumin fragments which can exhibit these characteristics are included in the scope of this invention. For example, the range from the methionine in the 123rd position to the proline in the 303rd position, as the central part in which drug bonding sites are concentrated, is mentioned as an example; the central part is not, however, limited to this range, but may be longer or shorter than the 123rd position to the 303rd

position, as long as most of the drug bonding sites are included in it. Moreover, as the C-end region in which long-chain fatty acid bonding sites are present, and which must therefore be removed, the range from the 304th position to the C-end is given as an example, but it is not limited to this example. The range may be longer or shorter, as long as it contains the long-chain fatty acid bonding sites. Furthermore, as the range of the N-end, which contains many cysteines and which therefore must be removed, the range from the N-end to the 122nd position is given as an example, but it is not limited to this range; it may be longer or shorter, as long as it is an N-end region which contains the cysteine in the 34th position.

Therefore, various albumin fragments can be designed, by referring to the following conditions; they fall within the scope of this invention. The essential conditions for designing human serum albumin fragments are that fragments be selected which can be expected to retain steric structures required for bonding specific drugs. The points which need to be noted are: (i) the S-S bridges present in the structures of natural human serum albumins must be kept in their original forms; (ii) therefore, an even number of cysteine residual groups must be present in the polypeptide chains forming the fragments; and (iii) cuts must not be made in the polypeptide chains which form loops by being bonded by S-S bridges. That is, several of the important domain structures, or at least the subdomain structures,

which are present in natural human serum albumin molecules, must not be destroyed.

1. Gene Systems

Host

Normal human serum albumins have many disulfide bonds in their molecules; in order to manufacture normal human serum albumins or fragments thereof which have the same steric structures as the natural ones by recombinant DNA methods, it is necessary that these disulfide bonds be correctly formed in the producing host cells. It has recently been demonstrated that, in order to produce normal steric structures, the enzymes protein disulfide isomerase, peptidyl prolyl cis-trans isomerase, etc., must contribute; it is predicted that, in prokaryotic cells such as coliform bacilli and hay bacteria, which contain almost no proteins which have many S-S bonds and assume complex steric structures, the activities of enzyme systems which are related to this kind of steric structure formation (folding), even if present, will not be strong. On the other hand, it is known that the cells of eukaryotic higher organisms, especially human beings, secrete many proteins which have complex higher-order structures (including glycoproteins and other modified proteins) from their cells. However, even yeasts, which are lower eukaryotes, are known to secrete proteins by pathways which resemble very closely those by which proteins are secreted in the cells of mammals

[Huffaker, T. C. and Robbins, P. W., J. Biol. Chem. **257**, 3203-3210 (1982); Snider, M. D., in Ginsburg, V. and Robbins, P. W. (eds.), Biology of Carbohydrates, Vol. 2, Wiley, New York, (1984), pp. 163-198]. Therefore, many attempts have been made recently to cause genes from organisms of other species (especially mammals) (principally cDNA) to be expressed in yeast cells and to cause the proteins which are their gene products to be secreted from their cells. For example, extracellular excretion from yeasts have been reported for human interferon α , α , and γ , [Hitzeman, R. A., Leung, D. W., Perry, L. J., Kohr, W. J., Levine, H. L., Goeddel, D. V., Science **219**, 620-625 (1983)], bovine fetal prochymosin [Smith, R. A., Duncan, M. J., Moir, D. T., Science **229**, 1219-1224 (1985)], human epithelium

growth factor [Brake, A. J., Merryweather, J. P., Coit, D. C., Heberlein, U. A., Masiarz, F. R., Mullenbach, G. T., Urdea, M. S., Valenzuela, P., Barr, P. J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 4642-4646 (1984)], mouse interleukin 2 [Miyajima, A., Bond, M. W., Otsu, K., Arai, K., Arai, N., Gene **37**, 155-161 (1985)], human β -endorphin [Bitter, G. A., Chen, K. K., Banks, A. R., Lai, P.-H., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 5530-5534 (1984)], etc. The secretion efficiencies, however, vary widely depending on the target protein, from approximately 80% for mouse interleukin 2 to 4-10% for human interferon. Moreover, among these, intracellular transmission using signal peptides of the protein itself has been attempted for interferon, and

experimenters have been successful in cutting these signal peptides and excreting them. With respect to the others, the signal sequence necessary for intracellular transport of proteins of yeasts, such as the signal peptides of yeast invertase (SUC2), the leader sequence of connecting factors $\alpha 1$ (MF $\alpha 1$), etc., have been expressed in a form in which they are directly fused with the mature proteins which are the targets, and intracellular transport has been performed. Furthermore, there are few [proteins] which clearly undergo processing in the correct locations; in the case of human interferon, approximately half undergo correct processing, but in human β -endorphin, cutting occurs even within peptides.

The production of substances by genetic engineering using yeasts as hosts has the following characteristics:

1. Fermentation production by mass high-density culturing is easy and economical. Moreover, in comparison with culture cell systems of plants and animals, no particular strictly controlled culturing apparatus is required.
2. A great amount of experience in fermentation production has been accumulated.
3. Molecular genetic knowledge is accumulating rapidly.
4. It is easy to incorporate foreign genetic materials in cells and genomes.

5. The understanding of the genetics and physiology of intracellular transport and extracellular secretion of proteins is rising rapidly.
6. If suitable plasmid vectors are selected, foreign genes can be placed in 4 states: the episome state (using YEp plasmids); a state in which they are incorporated into the genome (using YIp plasmids); a state in which they can be replicated together with chromosomal DNA following cellular division, including the yeast centromeres (using YCp plasmids); and a state in which they can be replicated autonomously, including the autonomous replicating sequence (ARS) of yeast (using YRp plasmids).
7. Intracellular processing of signal peptides, pro sequence, etc., is possible.
8. The sugar chains discovered in glycoproteins synthesized by yeasts are high-mannose sugar chains which differ from the compound sugar chains in the glycoproteins of the higher plants and animals, but the addition of core sugar chains which occurs in the microcytes of yeasts is a process which is shared with the higher animals; the differences between the two are seen only in the addition of outer sugar chains.
9. Morphologically transformed bodies can be grown in complete synthesis culture media by adding vitamins, micro-quantity factors, etc.

10. Morphologically transformed bodies can be grown even by using crude sugar sources, rather than pure glucose.

On the basis of this background, yeast is used as the host in this invention.

(Prepro [purepuro] sequence)

In order to express human serum albumin fragments in yeast cells and cause them to be secreted efficiently, it is necessary for prepro sequence to be present in the N-ends. Moreover, it is necessary that these prepro sequence be removed at the time of the secretion of the target protein and that the said target protein be secreted in its mature form. For this reason, in this invention, the original prepro sequence of the human serum albumins are used as the prepro sequence which satisfy these conditions.

In order to increase the expression of proteins in yeast, it is desirable to use codons which are translated with good efficiency in yeast as the codons which encode the N-end regions of the said proteins. For this purpose, in this invention, synthetic DNA sequence which are formed from the codons used with high frequency in genes which are expressed with good efficiency in yeast are used as the DNA sequence which encode the aforementioned prepro sequence.

The following codons, for example, are used as these codons:

Lys=AAG	Trp=TGG	Val=GTT	Thr=ACT
Phe=TTC	Ile=ATC	Ser=TCT	Lau=TTG
Ala=GCT	Tyr=TAC	Arg=AGA	Gly=CGT

As an example of the DNA part which encodes a prepro sequence, the following sequence can be used:

AA	TTC	ATG	AAG	TGG	GTT	ACT	TTC	ATC	TCT	TTG
	G	TAC	TTC	ACC	CAA	TGA	AAG	TAG	AGA	AAC
		Met	Lys	Trp	Val	Thr	Phe	Ile	Ser	Leu

----->

EcoR I

TTG	TTC	TTG	TTC	TCT	TCT	GCT	TAC	TCT	AGA
AAC	AAG	AAC	AAG	AGA	AGA	CCA	ATG	AGA	TCT
Leu	Phe	Leu	Phe	Ser	Ser	Ala	Tyr	Ser	Arg

GGT	GTT	TTC	AGA	CG	
CCA	CAA	AAG	TCT	GCG	C
Gly	Val	Phe	Arg	Arg	

The EcoR I adhesion end is placed upstream from the codon of the Met of the N-end of the aforementioned sequence, and the aforementioned sequence is inserted into the vector by this limiting enzyme site. Moreover, as the codon of the Arg of the C-end of the aforementioned prepro sequence, CGC is used, rather than the codon which was mentioned above as desirable for translation in yeast; by this means, it is possible to link the 5'-end with the human serum albumin fragment which was cut by Cla I.

Human serum albumin fragment genes

The genes which encode human serum albumin A (cDNA) have already been cloned; their base sequence and the amino acid sequence which are inferred from the said base sequence are described in detail in Public Patent Application No. 63-037453. Therefore, in this invention, the plasmids pUC, HSA, CH, etc., which contain this cDNA can be used as the

source which provides the genes for encoding the human serum albumin fragments. Furthermore, the method of making these plasmids will be given below as a reference example.

Poly A sequence and AATAAA signal

The poly A sequence and AATAAA signal which are present downstream from the 3'-end of the code sequence are said to contribute to the stability of the mRNA of eukaryotes [Bergmann and Brawerman, Biochemistry, 16, 259-264 (1977); Huez et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 908-911 (1981)]. Therefore, in a desirable embodiment of this invention, these sequence are placed downstream from the cDNA which encodes the human serum albumin A. As the poly A sequence and AATAAA signal, these sequence, for example, which are naturally added to the human serum albumin cDNA, can be used. The human serum albumin A genes which contain these sequence have already been cloned, and are described in Public Patent Application No. 63-037453. As the source providing these sequence, one can use, for example, [lambda]gt11 (HSA-I A); the method for making them is described below as a reference example.

Promoters

In this invention, one can use any promoters which function in yeast cells. However, it is desirable to use, in this invention, structural promoters rather than inducible promoters. This is because, when induction operations have been performed by using inducible promoters,

the human serum albumin accumulates rapidly in the cells, disulfide bonds are formed between molecules, and molecules which have non-natural steric structures may be formed.

Among yeast promoters which show weak inducibility or are structural promoters; those which have strong activities are, for example, alcohol dehydrogenase (ADH I) promoter, glyceraldehyde-3-phosphoric acid dehydrogenase (GAP) promoter, and glyceric acid phosphoric acid kinase (PGK) promoter. This will be explained concretely by using ADH I promoter as an example in this invention.

The base sequence of a region of approximately 2,100 base pairs containing the yeast ADH I genes (ADC 1) has already been determined; besides the sequence of approximately 1,100 base pairs which encodes ADH I, a 5' side non-translation sequence of 750 base pairs and a 3' side non-translation sequence of 320 base pairs have been elucidated [Bennetzen, J. and Hall, B. J., Biol. Chem., 257, 3018-3025 (1982)]. The Goldberg-Hogness box (TATA box), which is thought to be the recognition sequence by means of RNA polymerase in transcription, is 128 bases upstream (-128 position) from the translation-initiating codon ATG; it is said that the ADH I promoter activity is not lost even if [everything] upstream from the Sph I recognition site which is in the -410 position is lost [Beier and Young, Nature, 300, 724-728 (1982)]. The result of transcription by the ADH I promoter reaches at least 1% of the whole poly (A) RNA

in ordinary yeasts [Ammerer, G., Methods Enzymol., 101, 192-201 (1983)].

Terminators

Cases have been reported in which the quantity of gene product is decreased by read-through in transcription [e.g., Zeret, K. S. and Sherman, F., Cell 28, 563-573 (1982)]. In order to prevent this phenomenon from occurring, it is desirable to place terminators downstream from the structural genes which are to be expressed. An example of placing yeast terminators downstream from exogenous genes to increase the expression of genes is, for example, an experiment in which calf chymosin was expressed by using a sandwich vector composed of PGK promoter/terminator; increases in expression of several fold to about 10-fold due to the introduction of the terminator were reported [Mellor et al., Gene, 24, 1-14 (1983)]. Terminators derived from various genes can be used for this purpose; for example, terminators from TRP 5 (a tryptophan-synthesizing enzyme) genes, CYC 1 (iso-1-cytochrome C) genes, etc., have been used. In the case of transcription to which powerful promoters contribute, it is thought that placing powerful terminators downstream from them in order to prevent read-through is more beneficial for controlling expression. Therefore, in this invention, it is desirable to use, for example, ADH I terminator, GAP terminator, etc., which are terminators of genes which have powerful promoters.

Vector elements

We have explained above the elements directly related to expression which are contained in the expression plasmids of this invention; however, the expression plasmids of this invention must also contain yeast replication origin points and signal genes. As yeast replication origin points, one can use, for example, the replication origin points of 2 μ m plasmid DNA derived from yeast. As the signal genes, one can use ordinary signal genes, such as genes which contribute drug resistance to the host, genes which supplement the nutritional demand ability of the host, etc. Furthermore, since it is necessary to perform the replication of plasmids in coliform bacilli when plasmid recombination operations are performed, it is desirable that the plasmids of this invention be shuttle [shatoru] vectors which contain coliform bacilli replication origin points and signal genes. As vectors which satisfy the basic conditions for such shuttle vectors, one can use the commercial plasmid pJDB207, etc. The yeast signal genes of this plasmid pJDB207 are LEU 2 genes which encode the β -isopropyl malic acid dehydrogenase enzyme, a leucine biosynthesis enzyme.

Expression plasmids

Therefore, in desirable expression plasmids of this invention, promoters, genes which encode human serum albumin fragments with leader sequence which encode prepro sequence connected to them, poly A sequence, and terminators are

inserted, in that order, into shuttle vectors which contain yeast replication origin points and signal genes, as well as coliform bacilli replication origin points and signal genes.

2. Morphological transformation

The morphological transformation of the host yeast by the plasmids of this invention can be performed by ordinary methods; a concrete example of this is given in Actual Example 9.

3. Yeast culture medium and recovery of human serum albumin fragments

The host yeasts which have been morphologically transformed by expression plasmids containing human serum albumin fragment cDNA can be cultured by ordinary yeast culturing methods. For example, they can be cultured in natural complete media such as YPD and even in incomplete synthesis media such as an SD medium with 1% yeast extract added.

The recovery of the human serum albumin fragments excreted from the cells after the culturing can be performed by various methods. It can be expected that the secreted human serum albumin fragments can be purified to a high degree by means of fractionating precipitation by ethanol, acetone, ammonium sulfate, etc.; isoelectric point precipitation; concentration by ultrafiltration, etc.; and combinations of various kinds of chromatography and the

aforementioned partial purification methods after the partial purification has been performed.

The method of making cDNA which encodes the whole normal human serum albumin A or most of it is described concretely in Reference Example 1. The whole of the DNA which encodes the target protein fragment can be chemically synthesized by the usual methods, or it can be prepared from the aforementioned cDNA. When it is prepared from the cDNA, the cDNA which encodes all or most of the normal human serum albumin A is cut by a suitable limiting endonuclease inside the 5' end or 3' end of the cDNA region which encodes the target protein fragment and the lacking end code sequence are made up by chemically synthesized DNA. Otherwise, the cDNA is cut by a suitable limiting endonuclease outside the 5' end or 3' end of the cDNA region which encodes the target protein fragment, and the excess DNA part can be removed by an exonuclease. Of these two methods, different methods for processing the 5' end and the 3' end can be combined.

In the example of this invention, as the DNA which encodes the fused protein of the signal peptide and propeptide of human serum albumin and mini-HSA, a fusion of the DNA which encodes the signal peptide and propeptide of human serum albumin and Asp1 to Pro152 of human serum albumin A from plasmid pUG-HSA-BH, which contains the DNA which encodes the signal peptide and propeptide and the whole length of the mature human serum albumin molecule, already described in Public Patent Application No. 63-

268302, and the DNA fragment which encodes Glu153 to Pro303, cut from the plasmid pUC-HSA-I described in Public Patent Application No. 63-268302, can be used. As the DNA which encodes the condensed HSA, the prepro sequence of human serum albumin from the cDNA clone HSA-II (described in the S 63 2/22 [i.e., Feb. 22, 1988] application part), lacking the part which encodes the carboxyl-end side of human serum albumin, and the part which encodes the condensed human serum albumin (Met123-Leu585) from pAT-trp-phoA-tHSA (described in the H 1. 9/25 [i.e., Sept. 25, 1988] application part), which contains the DNA sequence which encodes a fused protein of the signal peptide of coliform bacillus alkali phosphatase and condensed human serum albumin, are individually obtained and then connected by a suitable method.

The DNA which encodes the normal human serum albumin fragments of this invention can be expressed in itself, but it can also be expressed in a form in which it is linked with DNA encoding other peptides, and a fused protein can be obtained. Various peptides can be used as fusion partners for obtaining this kind of fused protein. One of these, for example, is the leader sequence of the human serum albumin. When the target human serum albumin fragment is obtained as this kind of fused protein, the leader sequence can be removed later, either in the cell or in a test tube, and the human serum albumin fragment obtained.

In order to express the human serum albumin fragment, for example, the DNA which encodes the fused protein is inserted into a suitable expression vector, e.g., a plasmid, after which the said vector is introduced into the host, as described above. As the host for the expression, one can use eukaryotic cells such as animal cells or yeasts, or prokaryotic cells such as bacteria; the vector is chosen according to the host.

Effectiveness of Invention

Since the albumin fragments which lack the C-end regions of this invention lack the long-chain fatty acid bonding sites which are present in the C-end, they have the advantage that they do not bond with long-chain fatty acids, but do bond with various drugs in their central regions. On the other hand, the albumin fragments which lack the N-end regions, lack Cys34 and many other cysteine residual groups and are advantageous for stable folding of proteins.

Next, the manufacturing of the human serum albumin fragments of this invention will be explained concretely by means of actual examples.

In the actual examples, unless otherwise mentioned specifically, the enzyme reactions for treating the DNA were performed under the following conditions.

Experimental Method

Enzyme Reactions

The various enzyme reactions were performed under the following conditions. Digestion of DNA by the limiting enzymes EcoR I (Nippon Gene Co.; 20 units/ μ l), Hind III (Takara Shuzo Co.; 10 units/ μ l); BamH I (Takara Shuzo Co.; 18 units/ μ l); Xho I (Takara Shuzo Co.; 12 units/ μ l): sterilized distilled water was added to 2 μ g DNA, 1 μ l enzyme, and 2 μ l 10 x EcoR I buffer solution [1 M Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM MgCl₂, 500 mM NaCl] to make 20 μ l. Reaction was performed for 1 hour at 37°C to perform the cutting. In the cases of BstE II (Nippon Gene; 7.5 units/ μ l) and Pat I (Nippon Gene; 20 units/ μ l), instead of the 10 x EcoR I buffer solution, 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 70 mM MgCl₂, and 1.5 M NaCl were used; the reaction was performed by holding the temperature for 1 hour at 60°C, for BstE II, and 37°C, for Pat I. In the case of Sun I (Nippon Gene; 10 units/ μ l), instead of the 10 x EcoR I buffer solution, 4 μ l 100 mM Tris HCl (pH 8.0), 70 mM MgCl₂, and 200 M KCl were used; the reaction was performed by holding the temperature for 1 hour at 37°C. The T4 ligase treatment was performed under the following conditions. Sterilized distilled water was added to 1 μ g vector DNA, a molar quantity of DNA fragment equal to that of the vector DNA, 2 μ l 10 x ligase buffer solution [660 mM Tris-HCl (pH 7.5), 66 mM MgCl₂, 100 mM dithiothreitol, 1 mM ATP] and 1 μ l T4 DNA

ligase (Takara Shuzo [Co.]; approximately 400 units/ μ l) to make 20 μ l, and the temperature was held at 16°C overnight.

Actual Example 1. Formation of mini-HSA expression plasmid in yeast

The formation of the mini-HSA expression plasmid was performed as follows. First, the fragment which encodes the natural HSA prepro sequence and Asp1-Pro152, cut from pUC-HSA-EH (Reference Example 3) by EcoR I-Hpa II, and the fragment which encodes Glu153-Pro303, cut from pUC-HSA-I (Reference Example 5) by Hpa II-Pst I, were inserted into the EcoR I-Pst I site of the plasmid pUC19, to make the plasmid pUC-mHSA-EH. This pUC-mHSA-EH was cut at the EcoR I site, which is in the 5' end of the prepro HSA cDNA sequence; here, a synthesis linker both ends of which are EcoR I adhesion end sequences and which has an Xho I site inside it was inserted to make plasmid pUC-mHSA. The fragment cut from this pUC-mHSA by Xho I-Hind III and the region including the poly A signal and poly A sequence in the 3' side sequence of prepro HSA cDNA, cut from pUC-nHSA by Hind III-BamH I, were inserted at the Xho I-BamH I site to make plasmid pUC-mHSA-A. The plasmid pUC18X used here was made by inserting a synthesis linker body ends of which are EcoR I adhesion end sequences and which has an Xho I site inside it, in the same manner as was mentioned above, at the EcoR I site of pUC18. Moreover, pUC-nHSA is a plasmid which was made by the double digestion of the plasmid pAT-nHSA-A (Reference Example 8), containing the

natural prepro HSA cDNA sequence, by Xho I/BamH I, obtaining a fragment containing the prepro HSA cDNA part, and joining this with the large fragment obtained by the double digestion of pUC18X by Xho I/BamH I. Next, the Xho I-BamH I fragment containing the prepro mini-HSA translation region of the plasmid pUC-mHSA-A, the poly A signal and the poly A sequence was joined with the larger fragment cut from the pJDB-ADH-nHSA-A plasmid (the coliform bacillus Escherichia coli HB101/pJDB-ADH-nHSA-A containing this plasmid was internationally entrusted to the Microbiology Industry Technology Institute of the Agency of Industrial Science and Technology [in Japan], based on the Budapest Convention, on June 8, 1989, as FERM BP-2454) by Xho I-BamH I, making the pJDB-ADH-mHSA plasmid.

Actual Example 2. Formation of contracted HSA expression plasmid in yeast

The formation of the contracted HSA expression plasmid was performed as follows. First, the cDNA clone HSA • II, lacking the part which includes the carboxyl end side of the human serum albumin, was cut by EcoR I; the fragment produced was inserted at the EcoR I site of pUC19 to obtain plasmid pUC-HSA-IIB. The fragment containing the 5' side non-translation region of HSA and the natural HSA prepro sequence were cut out of the plasmid pUC-HSA-IIB by EcoR I-Taq I and inserted into the plasmid pUC18 at the EcoR I-Acc I site, making the plasmid pUC-Sig. The fragment containing the 5-side non-translation region of HSA and the natural HSA

joined to the larger fragment cut out of the plasmid pJDB-ADH-nHSA-A by means of Xho I-Sma I, making the expression plasmid in the yeast pJDB-ADH-tHSA.

Actual Example 3. Morphological transformation of yeast

The morphological transformation of the yeast by the HSA-fragment-expressing plasmids pJDB-ADH-mHSA and pJDB-ADH-tHSA was performed by a modification of the KUR method of Hideaki Hashimoto and Mitsuru Kimura [Hakko to Kogyo, 43, 630-637 (1985)]. First, 1 ml of an overnight YPD medium culturing solution of strain AH22 (MATa, leu2-3, leu2-112, his4-519, can1) was added to 50 ml of YPD medium [1% yeast extract (Difco), 2% Bactopeptone (?) (Difco), 2% glucose], and culturing was performed at 30°C until the absorbance at 600 nm reached 0.5. The bacteria were collected from this by centrifuging at 4°C and 2000 rpm for 5 minutes, and the bacterium bodies were suspended in 5 ml of 0.1 M LiSCN. Next, 1.5 ml of this were drawn off and the bacteria were collected by centrifuging at 2000 rpm for 5 minutes; the bacterium bodies were suspended in 10 μ l of 2 M LiSCN and 46 μ l of 50% polyethylene glycol 4000. 10 μ l of DNA solution (containing 5-10 μ g DNA) were added, and the temperature was held at 30°C overnight. 500 μ l sterilized distilled water were added to this suspension, and agitation was performed slowly with a vortex mixer, after which centrifuging was performed at 2000 rpm for 5 minutes to concentrate the bacteria. The bacterium bodies were resuspended in 100 μ l

sterilized distilled water, and this was sprinkled on an agar-agar medium for selection [SD medium: 20 μ g/ml histidine hydrochloride, 0.67% yeast nitrogen base containing no amino acids (Difco), and 2% glucose, to which 2% agar-agar was added]. After culturing for several days at 30°C, the colony obtained was examined by the method shown in Actual Example 4 to detect the expression of HSA fragments. In this way, AH22 (pJDB-ADH-mHSA) and AH22 (pJDB-ADH-tHSA) containing plasmids which expressed the respective HSA fragments were obtained.

Actual Example 4. Expression of HSA fragments

The aforementioned morphologically transformed AH22 (pJDB-ADH-mHSA) and AH22 (pJDB-ADH-tHSA) were cultured for 24 hours in 5 ml YPD medium at 30°C.

The detection of the HSA fragments secreted from the cells was performed as follows. The culture solution was centrifuged at 10,000 rpm for 5 minutes, after which 800 μ l of the supernatant were drawn off, 800 μ l ethanol were added, and the result was left standing in ice for 30 minutes. This was centrifuged at 12,000 rpm for 5 minutes and the precipitate obtained was dried in a centrifugal evaporator, after which the result was dissolved in 20 μ l SDS-PAGE sample buffer solution (2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 7% glycerol, 0.00625% bromophenol blue, and 0.0625 M Tris-HCl buffer solution, pH 6.8) and boiled for 5 minutes. After 10 μ l of this sample were subjected to

electrophoresis by 4-20% separation gel concentration SDS-polyacrylamide gel [Laemmli's method: Nature (London) 277, 680 (1970)], after which staining was performed with ~~Cumashi~~ ^{Coomassie} brilliant blue (CBB).

Moreover, Western blotting was performed as described below on the gel after electrophoresis was performed in this manner. That is, after the SDS-PAGE was completed, the gel was blotted on a nitrocellulose filter (Bio-Rad Co., Trans-blot^(R)) by using a blotting apparatus (Tefco Co., Model TC808). After the blotting was completed, the filter was treated for 30 minutes with a TBS solution [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 M NaCl] containing 3% gelatin; after this, washing was performed for 5 minutes with TTBS solution (TBS solution containing 0.05% Tween 20), changing the TTBS solution twice. Next, the filter was transferred to a solution of Toyo Wasabi peroxidase-tagged anti-HSA antibodies (Cappel [?] Co.), diluted 1000-fold with a TTBS solution containing 1% gelatin, and a treatment was performed for 1 minute. After the filter was washed twice with TTBS solution and once with TBS solution (5 minutes each time), it was transferred to a TBS solution containing 0.015% H₂O₂, 0.05% HRP color development reagent (Bio-Rad Co.), and 20 % methanol, and reaction was performed for 15 minutes. After this reaction was completed, the filter was washed with water.

The detection of the HSA fragments which had accumulated in the bacterium bodies was performed as

follows. That is, 300 μ l culture solution were centrifuged at 5000 rpm for 5 minutes to collect the bacteria, the bacterium bodies were suspended in 30 μ l SDS-PAGE sample buffer solution, and boiling was performed at 100°C for 10 minutes. 10 μ l of this sample were subjected to electrophoresis by the same method as above, and Western blotting was performed.

The results of the ^{Coomassie} ~~Cumashi~~-brilliant blue (CBB) staining are shown in Fig. 4. In this figure, lane 1 is the HSA standard, lanes 2 and 6 are the molecular weight standards, lane 3 is the AH22 (pJDB-ADH-mHSA) expression product, lane 4 is the host AH22 cultured material, and lane 5 is the AH22 (pJDB-ADH-tHSA) expression product. The results of the Western blotting are shown in Fig. 5. In this figure, lane 1 is the host AH22 cultured material, lane 2 is the AH22 (pJDB-ADH-tHSA) culture supernatant, lane 3 is the AH22 (pJDB-ADH-mHSA) culture supernatant, lane 4 is the HSA standard, lane 5 is the protein in the cultured cells of the AH22 (pJDB-ADH-tHSA), lane 6 is the protein in the cultured cells of the AH22 (pJDB-ADH-mHSA), and lane 7 is the protein in the cells of the host AH22.

As shown in the figure, mini-HSA was secreted from the bacteria, and was identified as the band at a molecular weight of approximately 35,000 in the SDS-PAGE. However, the contracted HSA was secreted in a small quantity in the medium; a large quantity was accumulated in the bacteria.

Actual Example 5. Purification and analysis of mini-HSA

The aforementioned morphologically transformed AH 22 (pJDB-ADH-mHSA) was cultured for 40 hours in 4 l YPD medium [1% yeast extract (Difco), 2% Bactopeptone [?] (Difco), 5% glucose] at 30°C. 1500 ml of this culture solution was cooled to 0°C and 1500 ml of -20°C ethanol were added, after which stirring was performed for 30 minutes at 0°C. The precipitate obtained by centrifuging at 12,000 rpm for 15 minutes was dissolved in 30 ml of 100 mM Tris-HCl buffer solution, pH 8.0, after which 100 µl of 10 mg/ml RNaseA (heat-treated) were added, and a treatment was performed for 15 minutes at room temperature. After this was dialyzed overnight against 750 mM NaCl and 10 mM sodium phosphate buffer solution, pH 6.9, it was centrifuged at 18,000 rpm for 10 minutes and the supernatant was obtained. This supernatant was injected into a hydroxyapatite high-performance liquid chromatography column [Tonen Hydroxyapatite TAPS-052110 (φ21 x 100 mm)] and eluted by a 10 mM-200 mM phosphoric acid concentration gradient at a flow rate of 3 ml/min, for 60 minutes. The identification of the mini-HSA peaks was performed by the 280 nm absorbance and by SDS-PAGE.

After the mini-HSA peaks obtained were dialyzed against water, freeze-drying was performed, and they were dissolved in 3 ml of 500 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, and 0.05% NaN₃. This sample was injected into a Sephacryl S-200 [Pharmacia Co., super-fine grade (1.5 x 90 cm)] gel

filtration column, and elution was performed at a flow rate of 8.6 ml/hr, using the same solution as the sample solvent. The identification of the mini-HSA peaks was performed in the same manner as above. Next, the mini-HSA peaks obtained were injected into a reverse-phase high-performance liquid chromatography column [TSK gel, phenyl-5PW RP (4.6 x 76 mm)], and elution was performed in the presence of 0.1% trifluoroacetic acid, at a flow rate of 1 ml/min, with an acetonitrile concentration gradient of 0%-70%, for 60 minutes. The result of identification by 280 nm absorbance was that the mini-HSA was detected as 2 peaks; these peaks were taken to be the final purified standard product.

Identification of N-end amino acid sequence of mini-HSA

After the purified mini-HSA sample was freeze-dried, it was dissolved in trifluoroacetic acid and the N-end amino acid sequence was identified by means of an amino acid sequence automatic analyzer (Applied Biosystems Co., Protein Sequencer 477A). The N-end amino acid sequences of the two mini-HSA identified by the amino acid sequence automatic analyzer were both as follows:

Asp-Ala-Hys-Lys-X-Glu-Val-Ala-

This sequence is the same as the N-end amino acid sequence of mature HSA. Thus, it was found that the same processing was performed in the expression and secretion of mini-HSA as with natural HSA.

Identification of amino acids of C-end of mini-HSA

After the mini-HSA sample purified above (approximately 1 nmol) was put into a test tube for hydrolysis and freeze-dried, 50 μ l hydrazine anhydride (Ardlich Co.) were added, and reaction was performed under a vacuum, at 100°C, for 5 minutes. After cooling to room temperature, the excess hydrazine was removed by vacuum, and further drying was performed overnight in a vacuum desiccator. This sample was analyzed for amino acids by using an amino acid automatic analyzer (Nippon Denshi Co., JLC-300), and the C-end amino acids were identified. Moreover, after the above sample was hydrolyzed by hydrochloric acid, the amino acid analysis was performed in the same manner, the sample was quantitatively determined, and the rate of recovery of C-end amino acids was obtained. As a result, the C-end amino acid of the mini-HSA was identified as Pro for both purification peaks by the hydrazine decomposition method. Since the constructed mini-HSA should have Pro on the C end, this result does not contradict that fact.

Analysis of amino acid composition of mini-HSA

The mini-HSA sample purified above (approximately 100 pmol) was put into a sample test tube and freeze-dried, after which it was put into a PICO-TAG (TM) workstation reaction vial. 500 μ l of constant-boiling-point hydrochloric acid (Wako Junyaku Co., for accurate analysis) were put into this reaction vial, and hydrolysis was

performed under a vacuum at 110°C. The reaction time was made 24, 48, and 72 hours. After the hydrolysis was completed, the hydrochloric acid in the sample test tube was removed under a vacuum, and the amino acid composition of the sample obtained was analyzed by using an amino acid automatic analyzer (Nippon Denshi, JLC-300).

The results are shown in the following table.

Peak 1 (small peak)			Peak 2 (large peak)		
Amino acid	Empirical value	Theoretical value	Amino acid	Empirical value	Theoretical value
Ala	35.0	35	Ala	35.0	35
Arg	12.8	14	Arg	13.4	14
Asx	31.9	31	Ala	31.7	31
Cys	ND	19	Cys	ND	19
Glx	45.5	42	Glx	45.3	42
Gly	12.8	14	Gly	7.5	7
His	11.4	10	His	11.0	10
Ile	4.9	5	Ile	5.1	5
Leu	29.6	32	Leu	30.0	32
Lys	28.3	28	Lys	28.0	28
Met	3.0	3	Met	2.6	3
Phe	16.9	17	Phe	17.0	17
Pro	11.4	12	Pro	12.0	12
Ser	10.9	12	Ser	11.7	12
Thr	11.7	12	Thr	11.8	12
Trp	ND	1	Trp	ND	1
Tyr	7.3	8	Tyr	7.6	8
Val	14.7	15	Val	14.8	15

ND = Not determined

ND = Not determined

As is clear from the table above, the empirical values obtained are almost exactly the same as the theoretical values, and, combined with the results for the N-end amino acid sequence and the C-end amino acids shown above, they show that the structure of the mini-HSA which was expressed and excreted was the structure that was constructed.

Reference Example 1. Screening of clones containing
normal human serum albumin A cDNA

For the sake of screening clones containing normal human serum albumin A cDNA by plaque [λ -phage] hybridization, a human liver cDNA library made by using [λ] gt11 of the U.S. Clontech Co. as the vector was used. The [λ] gt11 recombinant phages were inoculated, using coliform bacillus Y1090 as the host, and a total of 5.5×10^5 morphologically-transformed plaques were formed on an LB agar-agar medium (Luria medium + 1.5% agar-agar). After the recombinant DNA was transferred to a membrane filter (Amersham Co. Hybond-N), the screening was performed by using 3 kinds of synthetic oligonucleotides tagged with ^{32}P radioactive isotope (specific activities $\geq 10^7 \text{cpm}/\mu\text{g}$) as probes [Benton and Davis, Science **196**, 180-182 (1977)]. These 3 probes are the same sequences, respectively, as, among the human serum albumin cDNA sequences reported by Lawn et al. [Nucleic Acids Res. **9**, 6103-6114 (1981)], the one containing the 5' non-translation region (the part from 12 nucleotides upstream from the ATG codon of the translation start to the nucleotide before the ATG codon) and the translation region (the methionine codon of the amino end, i.e., the part encoding the 9th amino acid leucine from the ATG) (HSA-1); the one encoding the 260th leucine from the 248th glycine (HSA-2); and the one containing the part which encodes the carboxyl end 585th leucine from the 576th valine and the 3' non-translation

region composed of the following 6 nucleotides (HSA-3). The synthesis of this probe was performed by using an automatic DNA synthesizer; the tagging was performed by using [γ - 32 P] ATP and polynucleotide kinase. Among the 200 [λ] gt11 clones which gave positive signals with HSA-2, DNA was prepared from 4 [Blattner et al., Science 202, 1279-1284 (1978)], this was digested with EcoR I enzyme, and the Southern blot of the digested material was hybridized with the HSA-2 probe [Southern, E., J. Mol. Biol. 503-517 (1975)]. The hybridized fragments were obtained from 3 clones; their lengths were 1.8 kb, 1.4 kb, and 1.3 kb. Among these, the fragments with the lengths of 1.8 kb and 1.3 kb were sub-cloned with the pUC19 vector. These subclones were screened by colony hybridization [Grunstein and Hogness, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3961-3965 (1975)], using HSA-1 and HSA-3, respectively, as probes. As a result, a clone [λ] gt11 (HSA I-A) which hybridized only with HSA-3 was obtained. Various DNA fragments of this clone were transferred to the vectors for determining base sequences M13mp18 and mp19 RF-DNA, and the base sequences were determined by the dye deoxynucleotide termination method [Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467 (1977)]. On the other hand, with 20 of the clones which gave positive signals in the plaque hybridization of the [λ] gt11 clones performed by using HSA-2 as the probe, plaque hybridization was performed again using HSA-1 as the probe, and one clone

[lambda] gt11 (HSA-II) which gave a positive signal was obtained. Phage DNA was prepared from this, and the EcoR I-digested material was Southern-hybridized using HSA-1 as the probe; the 1.25 kb fragment (HSA-II) was confirmed to be hybridized with the probe. The base sequence of this fragment was determined by the ~~dye~~ deoxynucleotide termination method. HSA-II did not hybridize with the HSA-3 probe. As a result, it was found that HSA-II lacked the part which encodes the carboxyl end side, HSA-I-A lacks the part which encodes the amino end side of the human serum albumin, and the codon which encodes the 304th serine (TCA) was changed to opal codon TGA of the translation termination codon. Fig. 6 shows the limiting enzyme maps of these two DNA fragments. The accurate positions of the amino acid recognition sites were obtained from the final base sequence.

Reference Example 2. Preparation of plasmid pUC-HSA-CH
(Fig. 7)

The plasmid pUC-HSA-CH, containing the DNA which encodes the whole of the mature normal human serum albumin A, was prepared in the following manner.

A fragment was prepared from the clone [lambda] gt11 (HSA-II), containing HSA cDNA obtained from the human liver cDNA library, by EcoR I and Xba I digestion; this fragment was joined with the larger of the fragments obtained by double digestion of the pUC19 plasmid by EcoR I and Xba I,

using T4 DNA ligase, and the recombinant plasmid pUC-HSA-EX was constructed.

The smaller of the fragments produced from this plasmid by double digestion by Aha III and Sal I was prepared. This fragment encodes [the part] from the 12th Lys to the 356th Thr of the mature normal human serum albumin A protein. In order to construct the genes which encode the mature normal human serum albumin A protein from the amino end, the DNA sequence corresponding to the 5' end was made by annealing 2 chemically-synthesized fragments. This synthetic DNA sequence has the adhesion end sequence CG produced by cutting with the Hpa II and Cla I enzymes on the 5' end side, so that it can fuse with the DNA sequence which encodes the signal peptide of alkaline phosphatase, and it has the sequence which encodes [the part] from the first amino acid Asp to the 11th amino acid Phe of mature normal human serum albumin A. T4 polynucleotide kinase was caused to act on this annealed DNA sequence to phosphorylate the 5' end, and this was mixed with the product of double digestion by Aha III/Sal I, produced from pUC-HSA-EX. Furthermore, this was mixed with the larger of the fragments produced by double digestion by Cla I/Sal I of pAT153 (made by Amersham Co.; Twigg, A. J. and Sherratt, D., Nature 283, 216-218, 1980), a typical multi-copy cloning vector of coliform bacilli; these 3 [fragments] were joined by T4 DNA ligase, and the recombinant plasmid pAT-HSA-CX was obtained. On this plasmid, the DNA sequence encoding [the part] of the

normal human serum albumin A from the first amino acid Asp to the 11th amino acid Phe was connected. The pAT-HSA-CX was double-digested by EcoR I/Xba I, and the smaller fragment, containing the DNA sequence which encodes [the part] of the normal human serum albumin A from Asp1 to Phe356 was obtained.

On the other hand, as for the cDNA which encodes the carboxyl end side of the HSA-A, an EcoR I fragment [into which a] foreign cDNA sequence from the clone [lambda] gt11 (HSA I-A), obtained from the human liver cDNA library, was inserted was prepared, and it was cloned in the recombinant plasmid pUC-HSA-1' by inserting [it] at the EcoR I site of the pUC18 plasmid. In this way, [the part] of HSA-A from the 358th amino acid Leu to the 585th amino acid Leu of the carboxyl end was encoded; furthermore, a double digestion product by Xba I/Hind III, containing 62 nucleotides of the non-translation region of the 3' side, was prepared. This was mixed with the larger of the fragments of the double digestion product of EcoR I/Xba I obtained from pAT-HSA-CX and the double digestion product of EcoR I/Hind III of pUC19; a linking reaction was performed by T4 DNA ligase, and the recombinant plasmid pUC-HSA-CH, containing all of the cDNA of the mature normal human serum albumin A, was obtained.

Reference Example 3. Synthesis of DNA encoding prepro
sequence and preparation of plasmid
pUC-HSA-EH (Fig. 7)

Four oligonucleotides were synthesized which had the following sequences:

1. AATTCATGAAGTGGGTACTTTCATCTCTTTGTTGTT
2. AGAACAAGAACAACAAAGAGATGAAAGTAACCCACTTCATG
3. CTTGTTCTCTTCTGCTTACTCTAGAGGTGTTTTTCAGACG
4. CGCGTCTGAAAACACCTCTAGAGTAAGCAGAAG

by the phosphoamidite method described in Matteucci, M. D. and Caruthers, M. H., Tetrahedron Letters 21, 719 (1980), using an automatic DNA synthesizer (Applied Biosystems Model 380B). After the oligonucleotide fragments were 5'-phosphorylated by T4 polynucleotide kinase, annealing was performed. Next, they were joined by T4 DNA ligase, and one double-strand DNA which encoded the prepro sequence was obtained.

Next, the plasmid pUC-HSA-CH (Reference Example 2), which contains the cDNA of the normal human serum albumin A, was double-digested by the limiting enzymes EcoR I and Cla I, and the larger fragment was obtained; this was joined to the aforementioned synthetic DNA by T4 DNA ligase, and the plasmid pUC-HSA-EH was made.

Reference Example 4. Synthesis of DNA encoding Met(123)-
Ala(151) (Fig. 8)

The construction of a gene fragment which had a BamH I adhesion end on the 5' end, an Hpa II (Msp I) recognition sequence near the 3' end, and the double chain part of which completely encoded the Met(123)-Ala(151) of human serum albumin was performed as follows. In order to express [these genes] efficiently in coliform bacilli, a sequence was designed which contained as many codons as possible which are frequently used by genes which are expressed with high efficiencies in coliform bacilli (preferential codons). tRNA species with respect to these codons are generally present in large quantities in coliform bacilli [e.g., Ikemura, T. J., Mol. Biol., 151, 389-409 (1981); Gouy, M. and Gautier, C., Nucleic Acids Res., 10, 7055-7074 (1982)], and they can be expected to affect the translation efficiency.

The following 4 oligonucleotides:

5'-GATCCATGTGCACCGCTTCCACCACAACGAAGAAACCTTCC-3'

5-AGGTATTTTTTTCAGCAACGTTTCTTCGTTGTCGTGGAA
 AGCGGTGCACATG-3'

5'-TGAAAAATACCTGTACGAAATCGCTCGTCGTCACCCG
 TACTTCTACGCTCCGG-3'

5'-CGAAGAACAGCAGTTCCGGAGCGTAGAAGTACGGGTGA
 CGACGAGCGATTTCGTAC-3'

were synthesized by using an automatic synthesizer (Applied Biosystems Model 380B), applying the phosphoamidite method developed by Caruthers et al. [Matteucci, M. D. and

Caruthers, M. H., Tetrahedron Letters 21, 719 (1980)]. The DNA chains synthesized (approximately 30 pmoles) were treated in a solution of 50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10 mM MgCl₂, 5 mM dithiothreitol, and 0.2 mM ATP (50 μ l), in the presence of 6 units of T4 polynucleotide kinase (Takara Shuzo Co.), at 37°C, for 60 minutes, and their 5'-ends were phosphorylated.

The 4 phosphorylated fragments were mixed and kept in a 100°C water bath for 5 minutes, after which they were left to cool to room temperature and annealing was performed. 2 μ l of T4 DNA ligase (800 units, Takara Shuzo Co.) were added and the temperature was held at 16°C overnight, joining the fragments and making a double strand fragment. Next, this double strand fragment was cut with Hpa II (Msp I) to obtain a 96 bp fragment.

Reference Example 5. Preparation of DNA fragment
encoding human serum albumin
fragment Met(123)-Pro(303)
(Fig. 8)

The [λ]gt11 human cDNA clone (HSA-1A) lacking the part which encodes the amino end side of normal human serum albumin and containing a sequence in which the codon coding the 304th serine is changed to a translation termination codon (Reference Example 1, Fig. 6) was cut by EcoR I and the human serum albumin cDNA part was taken out; this was

inserted into the EcoR I site of plasmid pUC19, making plasmid pUC-HSA-I.

pUC-HSA-I was cut with Pst I and the 5'-end phosphoric acid group produced was removed by treating with bacteria alkaline phosphatase; after this, the result was cut with Hpa II (Msp I), and the 750 bp fragment was removed. This 750 bp fragment was joined with the 96 bp fragment synthesized in Actual Example 1 by means of T4 DNA ligase, using the correspondence of the adhesion ends of Hpa II (Msp I). After this, it was joined with the larger fragment of the double digestion product of pUC19 by BamH I and Pst I, by means of T4 DNA ligase, and the pSAL II plasmid was obtained.

Reference Example 6. Insertion of poly A sequence and
AATAAA signal sequence (Fig. 9)

[Lambda] gt11 (HSA-I A), containing the 3' side region of the cDNA of human serum albumin A (Reference Example 1, Fig. 6) was digested by EcoR I to obtain a DNA fragment containing the cDNA of human serum albumin A; this was joined to the plasmid pUC18, cut by EcoR I, and plasmid pUC-HSA-I' was obtained.

Reference Example 7. Construction of plasmid pAT-nHSA
(Fig. 9)

The prepro human serum albumin A cDNA part was cut from the plasmid pUC-HSA-EX containing the 5'-non-translation region and the former half of the coding region of prepro

human serum albumin A cDNA, by double digestion by means of EcoR I and Xba I, and [this fragment] was joined with the Xba I-Hind III fragment cut from the plasmid pUC-HSA-I', containing the latter half of the coding region of the cDNA of human serum albumin A and the 3'-non-translation region, and the EcoR I-Hind III fragment of the pAT153 vector [Amersham Co.: Twigg, A. J. and Sheratt, D., Nature, 283, 216-218 (1980)], obtaining plasmid pAT-HSA-EH. In order to place a powerful yeast-derived promoter of the cDNA sequence encoding prepro human serum albumin A adjacent to it, the EcoR I site, which is attached to the 5' end of the cDNA sequence, and the BstE II site, which is from the 3rd amino acid Trp to the 5th amino acid Thr, encoding the signal peptide of prepro human serum albumin A, were used. The EcoR I-BstE II fragment, containing the 5'-non-translation region of the prepro human serum albumin A and the sequence which encodes the 3 amino acids from the amino end of the signal peptide, was cut from pAT-HSA EH. The remaining large DNA fragment was joined to the synthetic DNA fragment:

EcoR I	BstE II
5'-AATTCATGAAGTGG	
GTACTTCACCCATTG-5'	

which has an EcoR I adhesion end sequence on the 5'-end and an BstE II adhesion end sequence on the 3'-end and can encode up to the 3rd amino acid of the signal peptide of the prepro human serum albumin A. That is, by treating this synthetic fragment with T4 polynucleotide kinase, the 5'-end

was phosphorylated, and the connection was made with T4 DNA ligase. [In this way,] the plasmid pAT-nHSA, which contains natural-type prepro human serum albumin A cDNA, was made.

Reference Example 8. Preparation of plasmid pAT-nHSA-A
(Fig. 1)

pAT-nHSA (Reference Example 7) was cut at the EcoR I site, on the 5'-end of the prepro human serum albumin A cDNA sequence, and the synthetic linker

EcoRIXhoIEcoRI

5'-AATTCTCGAG

GAGCTCTTAA-5',

which has an EcoR I adhesion end sequence on either end and an Xho I site within it, was inserted, producing the plasmid pAT-X-nHSA. The Hind III-BamH I fragment, derived from the pAT153 plasmid, which is adjacent to the 3'-end of the prepro human serum albumin A cDNA sequence in this pAT-X-nHSA, was cut out and replaced with the Hind III-BamH I fragment containing the region which contains the poly A signal and the poly A sequence and the pUC18-vector-derived region, in the 3'-side sequence of the prepro human serum albumin A cDNA, which was cut from pUC-HSA-I', producing the plasmid pAT-nHSA-A.

4. Simple Explanation of Figures:

Figs. 1-1 and 1-2 show the process of producing the mini-HSA-expressing plasmid pJDB-ADH-mHSA.

Fig. 6 shows a limiting enzyme map of the cDNA encoding human serum albumin.

Fig. 7 shows the process of producing plasmid pUC-HSA-EH.

Fig. 8 shows the process of producing plasmid pSAL II.

Fig. 9 shows the process of producing plasmid pAT-nHSA.

Fig. 10 shows the process of producing plasmid pAP-nHSA-A.

Applicant: Tonen Co., Ltd.
 Attorneys: Akira Aoki, Esq.
 Satoshi Ishida, Esq.
 Kiyoshi Fukuki, Esq.
 Teruyuki Yamaguchi, Esq.
 Masaya Nishiyama, Esq.

(Continued from page 1)

Int. Cl.⁵ Identification Code Internal File Nos.

C 07 K 15/16	8619-4H
C 12 N 1/19	9050-4B
15/62	
C 12 P 21/02 ZNA C	8214-4B
//(C 12 N 1/19	
C 12 R 1:865)	
(C 12 P 21/02	
C 12 R 1:865)	

[Keys to figures:]

Fig. 1-1

1. Small fragment
2. Large fragment
3. Multi-cloning site
4. Synthetic linker
5. (To Fig. 1-2)

Fig. 1-2

1. (From Fig. 1-1)
2. Multi-cloning site
3. Small fragment
4. Large fragment
5. Promoter

Fig. 2-1

1. Small fragment
2. Large fragment
3. Cut fragment
4. (To Fig. 2-2)

Fig. 2-2

1. (From Fig. 2-1)
2. Small fragment
3. Large fragment
4. (To Fig. 2-3)

Fig. 2-3

1. (From Fig. 2-2)
2. Small fragment
3. Large fragment

Fig. 3

1. Linker

Fig. 6

1. Base pairs
2. Prepro leader sequence
3. Mature HSA coding region
4. Poly A

Fig. 7

1. Synthetic DNA (corresponding to Asp1-Phe11)
2. Synthetic DNA fragment
3. EcoR I + Cla I digestion
4. Linking

Fig. 8

1. Synthetic fragment encoding Met(123)-Ala(151)
2. BamH I conforming end
3. Hpa II site
4. (Human chromosomal DNA part)
5. Fragment
6. Multi-cloning site
7. Linking
8. T4 DNA ligase
9. Coliform bacillus TB-1 morphological transformation
10. Coliform bacillus alkaline phosphatase treatment

Fig. 9

1. Linking

Fig. 10

1. Linker
2. Promoter
3. Terminator

第7図はプラスミド pUC-HSA-EH の作製過程を示す。

第8図はプラスミド pSAL II の作製過程を示す。

第9図はプラスミド pAT-mHSA の作製過程を示す。

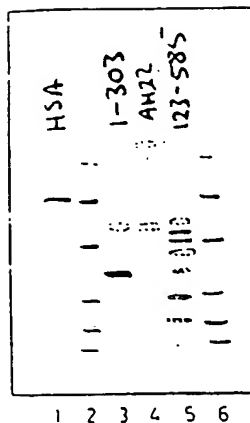
第10図はプラスミド pGAP-mHSA-EH の作製過程を示す。

特許出願人

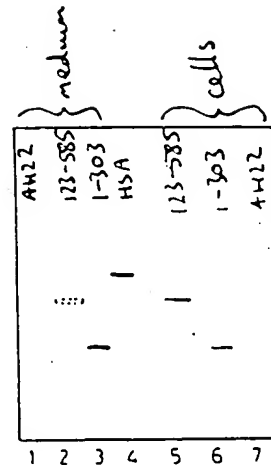
東 燃 株 式 会 社

特許出願代理人

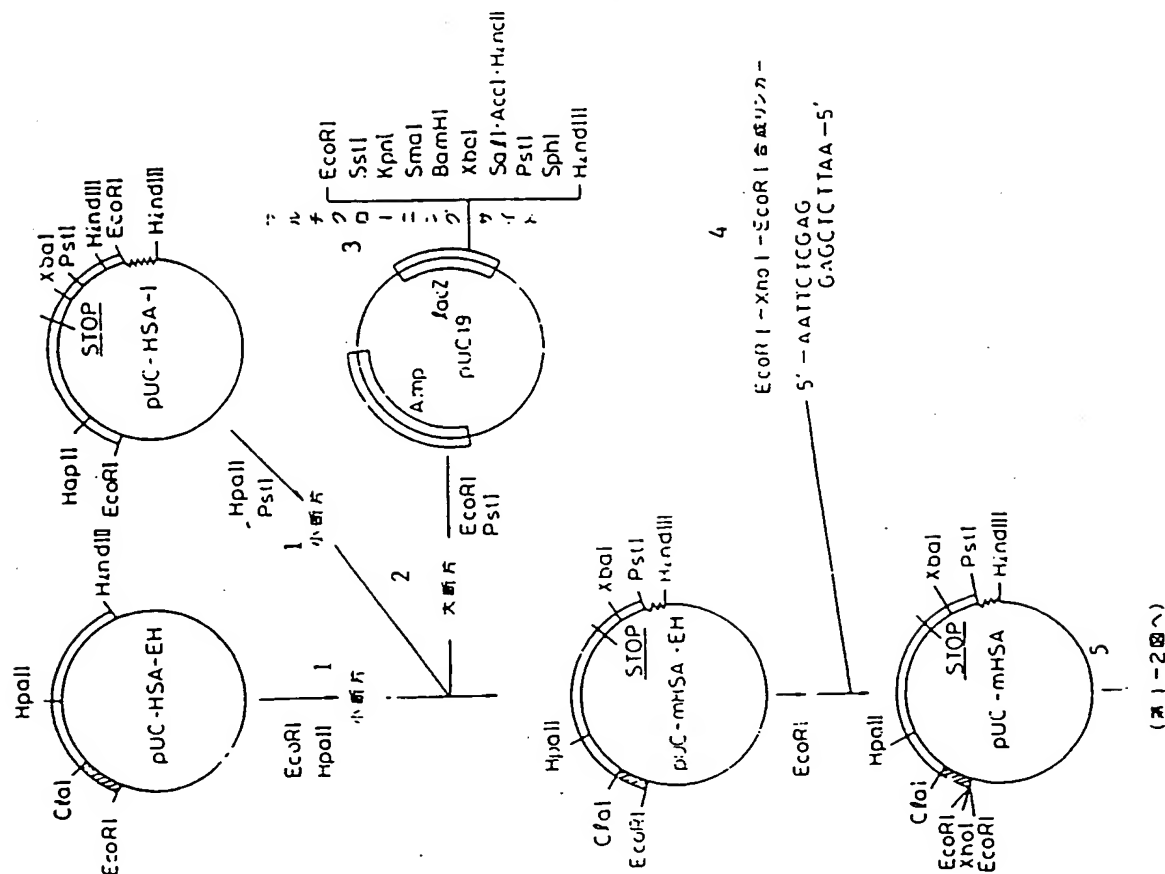
弁 理 士 青 木 朗
弁 理 士 石 田 敬
弁 理 士 堀 木 清
弁 理 士 山 口 昭 之
弁 理 士 西 山 雅 也



第 4 図

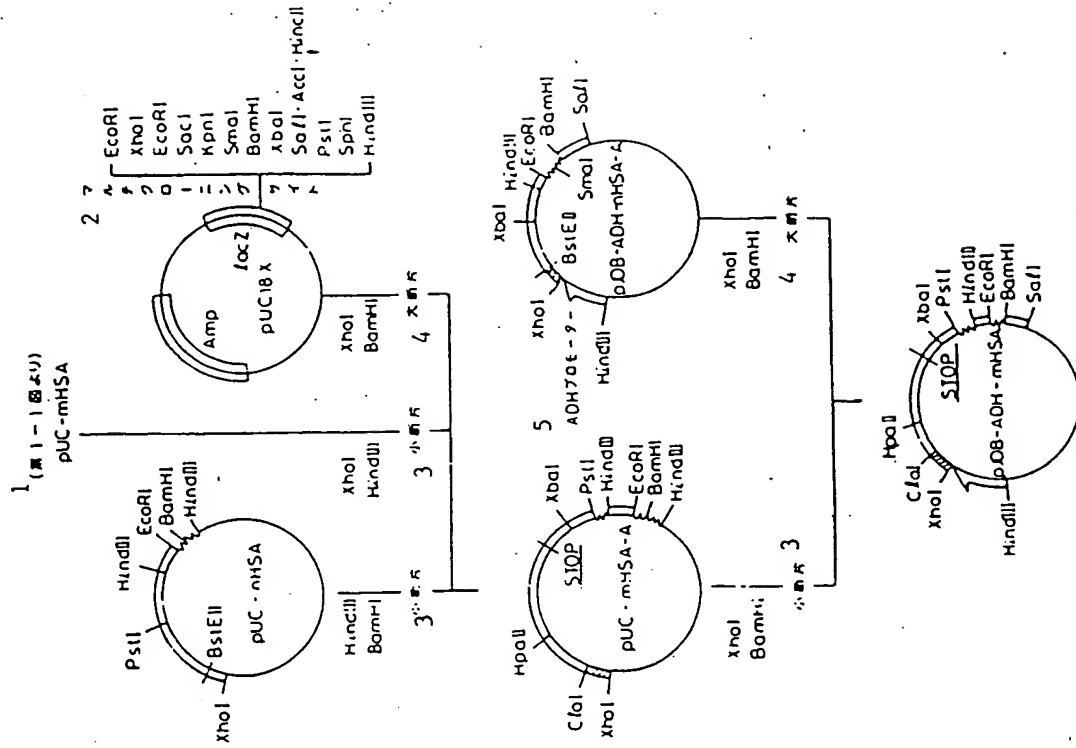


第 5 図

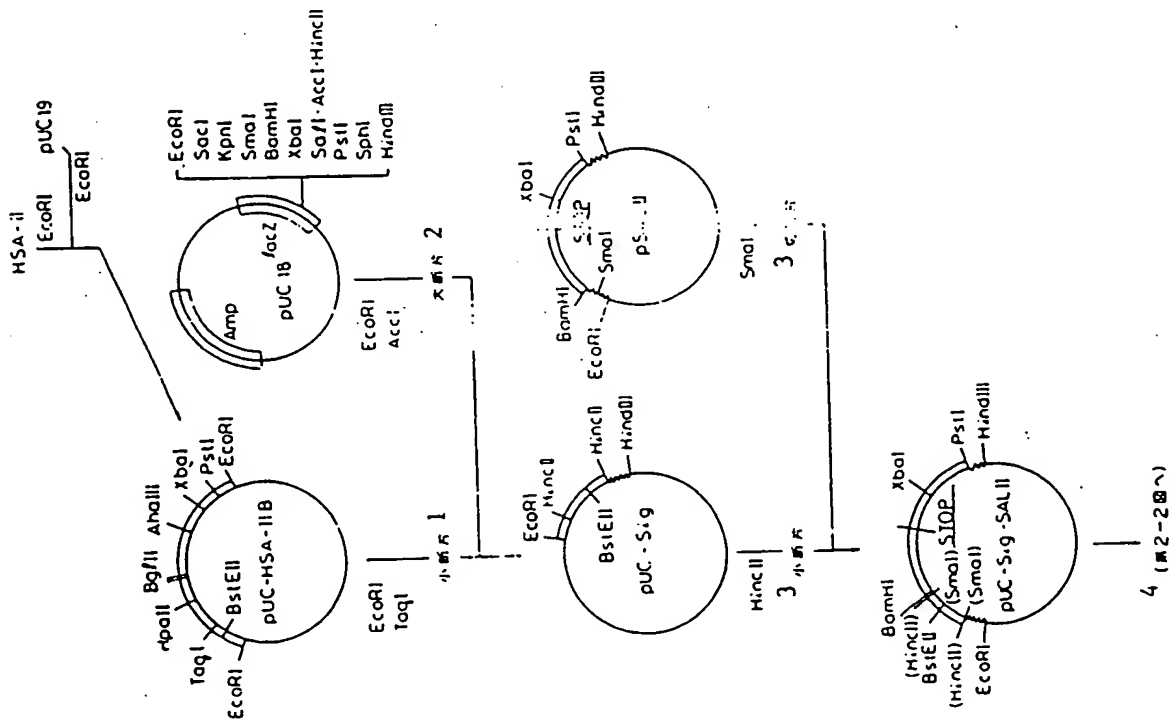


第1-1図

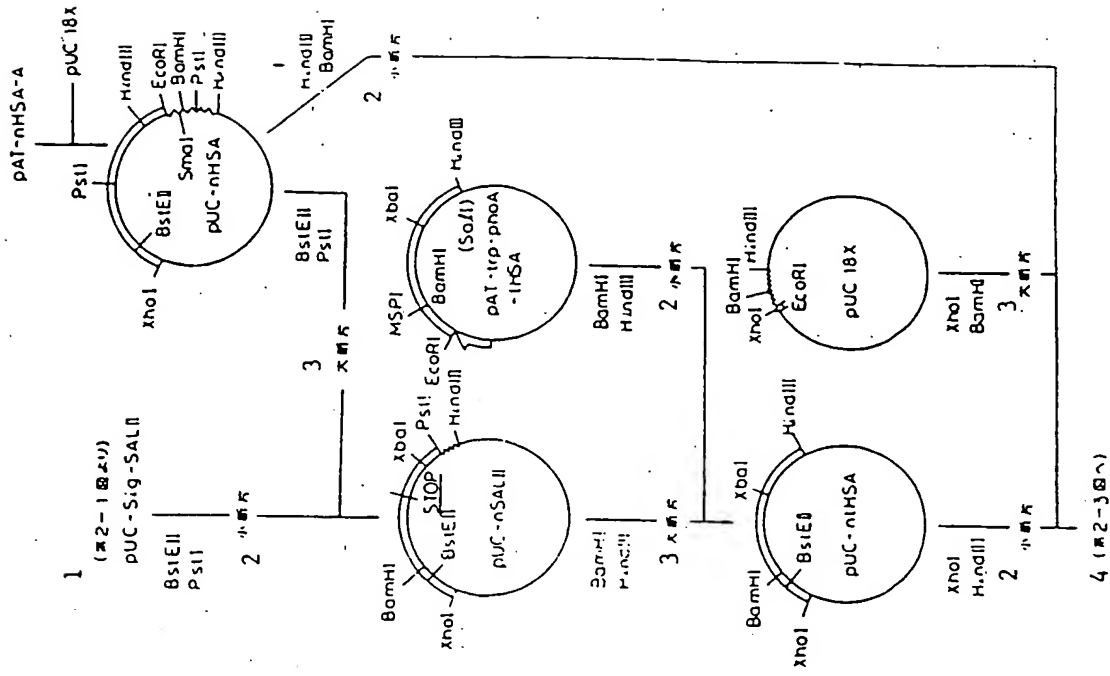
(第1-2図へ)



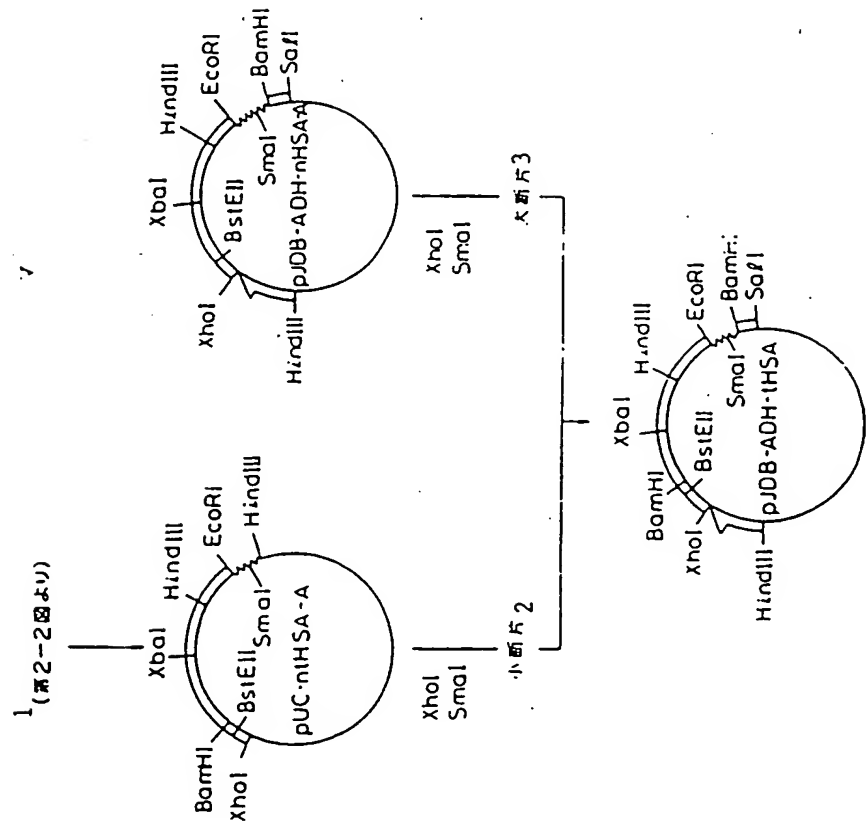
第1-2図



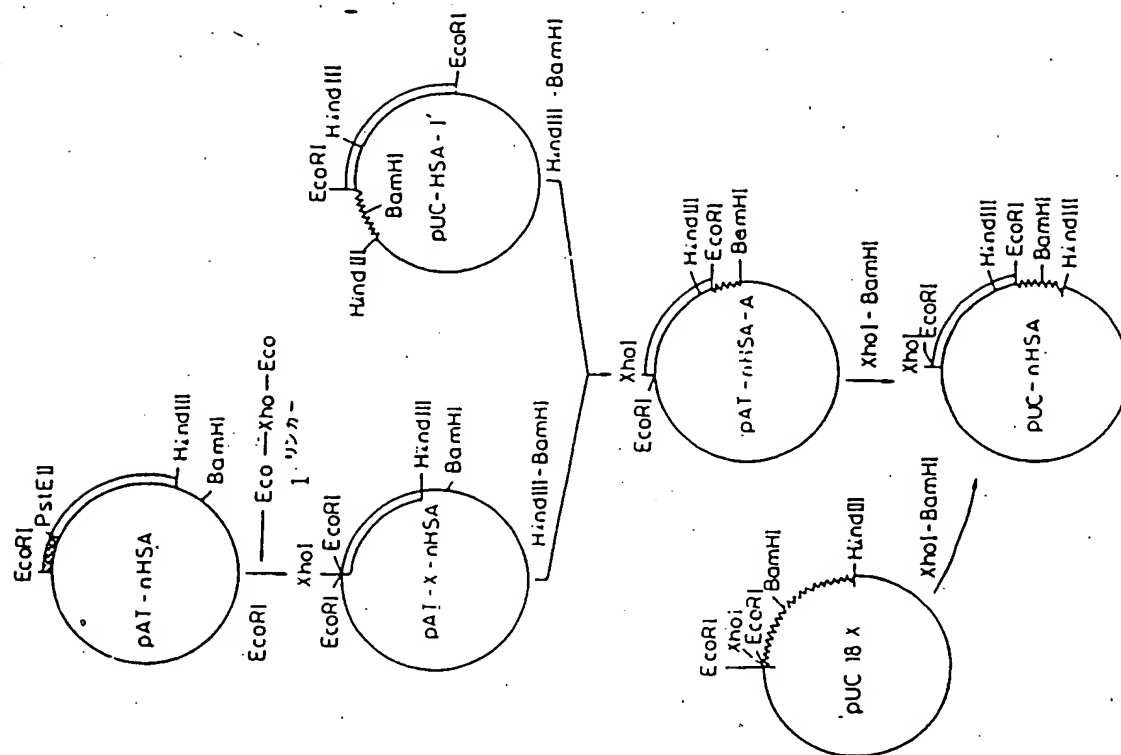
第2-1図



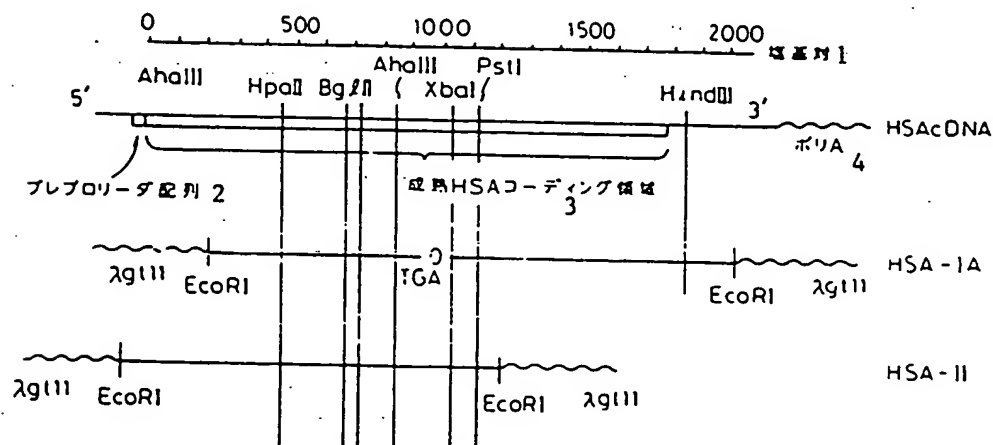
第2-2図



第2-3図

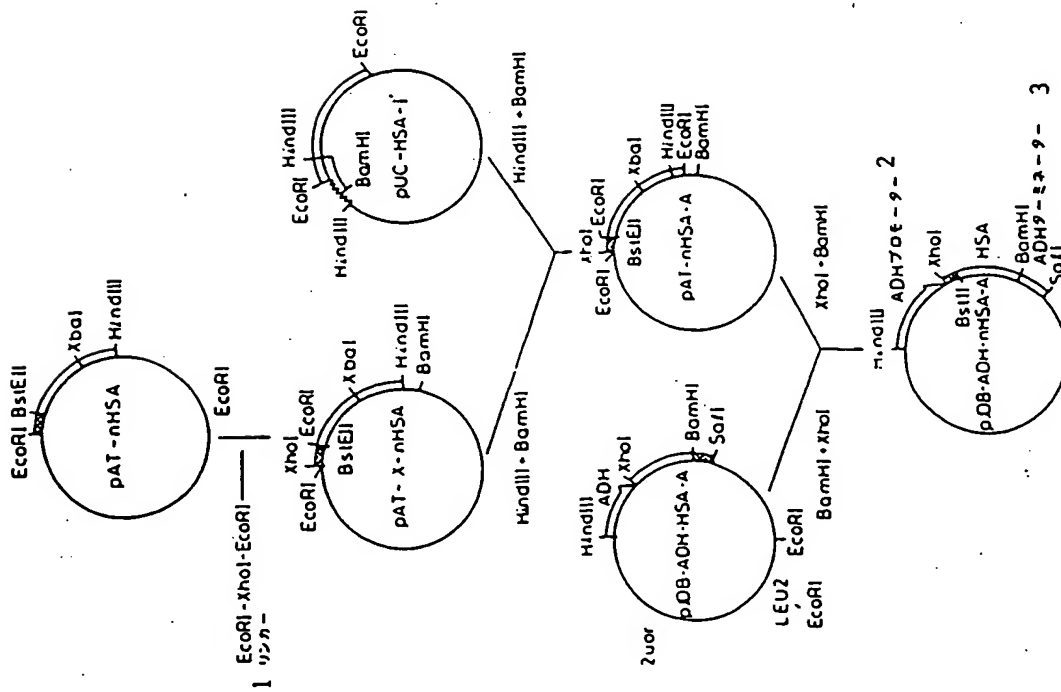


第 3 図



第 6 図





第 9 図

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.